# Identifizierung Y-spezifischer RNA in männlichen Keimzellen von *Drosophila hydei*

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Corinna Herrnstadt

aus Düsseldorf

Düsseldorf

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538101_0040

# Identifizierung Y-spezifischer RNA in männlichen Keimzellen von *Drosophila hydei*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Corinna Herrnstadt

aus Düsseldorf

Düsseldorf
1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | |
| II. | MATERIAL UND METHODEN | 13 |
| 1. | Chemikalien und Enzyme | 13 |
| 2. | Abkürzungen und Symbole | 14 |
| 3. | Drosophila hydei: Genetische Grundlagen | 15 |
| 4. | Isolierung von Nukleinsäuren aus Fliegen durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation | 16 |
| 5. | Isolierung von RNA aus Hodenanlagen und Hoden | 17 |
| 5.1. | Reinigung von RNA durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation | 18 |
| 5.2. | Isolierung von poly(A)-haltiger RNA | 19 |
| 5.3. | Isolierung von RNA mittels Phenolextraktion | 20 |
| 6. | Restriktion von DNA | 20 |
| 7. | Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Transfer auf Nitrocellulose-Filter oder DBM-Papier | 21 |
| 7.1. | Horizontale Agarose-Gele | 21 |
| 7.2. | Transfer von DNA auf Nitrocellulose-Filter | 22 |
| 7.3. | Transfer von RNA auf DBM-Papier | 23 |
| 7.4. | Vertikale Agarose-Flachgele | 23 |
| 7.5. | Transfer von RNA auf Nitrocellulose-Filter | 24 |

| | | |
|---|---|---|
| 8. | Trennung von RNA durch Zonenzentrifugation und Fixierung an Nitrocellulose-Filtern oder DBM-Papier | 25 |
| 8.1. | Lineare Saccharose-Dichtegradienten | 25 |
| 8.2. | Fixierung von RNA an Nitrocellulose-Filtern | 25 |
| 8.3. | Fixierung von RNA an DBM-Papier | 26 |
| 9. | Hybridisierungen an Nitrocellulose-Filtern mit fixierter DNA | 26 |
| 9.1. | DNA/DNA-Hybridisierungen | 26 |
| 9.2. | RNA/DNA-Hybridisierungen | 27 |
| 10. | Hybridisierungen an Filtern mit fixierter RNA | 27 |
| 10.1. | DNA/RNA-Hybridisierungen an Nitrocellulose-Filtern | 27 |
| 10.2. | DNA/RNA-Hybridisierungen an DBM-Papier | 28 |
| 11. | Szintillationszählung | 29 |
| 12. | Zytologische Präparationen | 29 |
| 12.1. | Kerne primärer Spermatozyten aus Hoden | 29 |
| 12.2. | Polytäne Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen | 30 |
| 12.3. | Metaphase-Chromosomen aus larvalen Ganglien | 30 |
| 13. | "In situ"-Hybridisierungen | 31 |
| 13.1. | Vorbehandlung der Präparate | 31 |
| 13.2. | Experimenteller Aufbau | 32 |
| 13.3. | DNA/DNA-Hybridisierung | 33 |
| 13.4. | DNA/RNA-Transkripthybridisierung | 33 |
| 13.5. | Schmelzanalyse von DNA/RNA-Hybriden | 34 |
| 14. | Autoradiographie und zytologische Färbungen | 35 |
| 15. | Technik der Nicktranslation | 36 |
| 16. | Herstellung von $^{3}$H-cDNA | 37 |

17. Radioaktive Nukleinsäuren als Proben für Hybridisierungen 38
17.1. Genom-DNA der X/Y-Konstitution 38
17.2. Y-Chromosom-spezifische DNA 39
17.3. Y-Chromosom-spezifische RNA 40
17.4. Ribosomale DNA 40
17.5. cDNA vom 38S-rRNA-Precursor 41
17.6. cDNA Y-spezifischer Transkripte 42
17.7. Poly(dT) 43

III. NUKLEINSÄURE-HYBRIDISIERUNGEN: TECHNIKEN, REAKTIONSBEDINGUNGEN UND RESULTATE 44

1. Herstellung einer DNA-Probe zur Identifizierung Y-spezifischer Sequenzen 44

2. Artefakte in "in situ"-Hybridisierungen 45
2.1. "In situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung ohne Ausschluß von DNA/DNA-Wechselwirkungen 45
2.2. Unkontrollierbare Reaktionen in "in situ"-DNA/DNA-Hybridisierungen 47

3. DNA/DNA- und DNA/RNA-Hybridmoleküle in Formamid-Lösungen 49
3.1. Oberlegungen und Berechnungen 49
3.2. Schmelzanalyse von D. hydei DNA 51
3.3. Thermische Stabiltät von DNA/RNA-Hybriden "in situ" 53

4. "In situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung unter stringenten Bedingungen 57
4.1. Hybridisierung unter Ausschluß von DNA/DNA-Wechselwirkungen 57
4.2. Basenzusammensetzung und Stabilität der DNA/RNA-Hybride 59

| | | |
|---|---|---|
| 4.3. | Vergleich von Hybridisierungsbedingungen: Demonstration spezifischer und artefizieller Resultate | 62 |
| 5. | "In situ"-Hybridisierungsexperimente: optimale Resultate und ihre Reproduktion | 68 |
| 5.1. | Externe Artefakte | 68 |
| 5.2. | Reaktionspartner und Hybridisierungsbedingungen | 69 |
| 5.3. | Effizienz der Hybridisierungsrate: mechanische und dynamische Probleme | 70 |
| 6. | Standardmethoden für Filterhybridisierungen und ihre Kontrolle | 71 |
| 6.1. | Hybridisierungsbedingungen und unkontrollierbare Reaktionen | 71 |
| 6.2. | DNA-Absorption durch deaktiviertes DBM-Papier | 75 |
| 7. | Technik zur Fixierung von RNA an Nitrocellulose-Filtern | 77 |
| IV. | RESULTATE VON HYBRIDISIERUNGEN UNTER STRINGENTEN BEDINGUNGEN: IDENTIFIZIERUNG Y-SPEZIFISCHER NUKLEOTID-SEQUENZEN | 81 |
| 8. | Y-spezifische DNA und ihre genetische Aktivität in der meiotischen Prophase | 81 |
| 9. | Y-spezifische DNA in "in situ"-Hybridisierungen an Mitose-Chromosomen | 85 |
| 10. | "In situ"-Hybridisierung an Transkripte Y-chromosomaler Lampenbürstenschleifen | 85 |
| 10.1. | Identifizierung und Lokalisation Y-spezifischer RNA | 85 |
| 10.2. | Kontrollexperimente | 87 |

10.3. Schleifenspezifität der Transkripte 90

11. Akkumulation Y-spezifischer RNA an den Lampenbürstenschleifen 93

12. RNA-Synthese und -Speicherung in Spermatozytenkernen 93

13. Analyse Y-spezifischer RNA 98
13.1. Identifizierung und Isolation 98
13.2. Charakterisierung 103

V. DISKUSSION 105

1. Y-chromosomale Lampenbürstenschleifen in Keimzellen: Thesen und Resultate 105
2. Hybridisierungsexperimente: Techniken und Reaktionen 108
3. Theorie spezifischer Hybridbildung und Einsatz der "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierungstechnik 112
4. Interpretation von Autoradiogrammen 116
5. "In situ"-Hybridisierung an Lampenbürstenschleifen und Y-spezifische Transkripte 118
6. Funktion des Y-Chromosoms und seiner Genprodukte in der Spermiogenese 122
7. Nachwort 125

VI. ZUSAMMENFASSUNG 128

VII. LITERATURVERZEICHNIS 131

VII. ANMERKUNGEN 138

IX. LEBENSLAUF 140

# I. EINLEITUNG

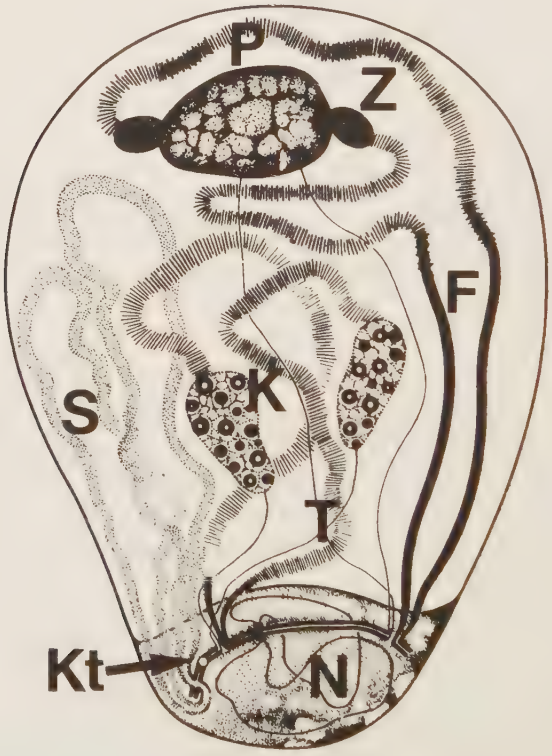
Die Spermatogenese in Drosophila hydei ist auf der Basis zytologischer Untersuchungen weitgehend charakterisiert. Sie beginnt mit primären Spermatogonien im apikalen Teil des Hodens, die umhüllt von je zwei Zystenzellen als sekundäre Spermatogonien eine Zyste bilden. In jeder Zyste entstehen durch mitotische Teilungen meist acht Spermatogonien, die nun in die meiotische Prophase eintreten. In diesem Stadium bildet in den Zellkernen der primären Spermatozyten das Y-Chromosom lichtmikroskopisch gut sichtbare Funktionsstrukturen aus, die zum Ende der Prophase zurückgebildet werden. Die folgenden zwei meiotischen Teilungen bilden 32 Spermatiden pro Zyste, die im Verlauf der Spermiogenese elongieren bei gleichzeitigen umfassenden räumlichen und strukturellen Veränderungen der Zellorganellen und schließlich als reife Spermien aus der Zyste in das Hodenlumen gelangen.

Die auffallenden Strukturen in den Kernen der primären Spermatozyten sind ein allgemeines Charakteristikum der Spermatogenese von Drosophila (Hess und Meyer, 1963). Sie wurden zuerst beschrieben für D. melanogaster und bekannt als die sogenannten "Fertilitätsfaktoren" (Meyer, Hess und Beermann, 1961), die essentiell sind für eine Produktion motiler Spermien (Hess, 1967, 1968, 1970, 1974). Die morphologische Ausprägung dieser Funktionsstrukturen ist bei den einzelnen Drosophila-Spezies sehr unterschiedlich. Besonders deutlich erkennbare und gut zu unterscheidende Strukturen wurden in D. hydei beobachtet (Meyer, 1963), sodaß umfassende zytogenetische Analysen möglich waren (Zusammenfassung: Hess, 1981).

In den Kernen primärer Spermatozyten von D. hydei wurden etwa sechs Schleifenpaare identifiziert und ihre Bildungsorte auf dem Y-Chromosom kartiert (Abb. 1) (Hess, 1965).

Abbildung 1:

Schema eines X/Y-Spermatozytenkerns mit den Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms (entnommen aus: Hess, 1971). F: Fäden, K: Keulen, Kt: Kinetochor, N: Nukleolus, P: Pseudonukleolus, S: Schlingen, T: Tubulibänder, Z: Zapfen.



Im Zellzyklus von Keimbahnzellen vieler Tierarten ist die meiotische Prophase ein Stadium hoher Genaktivität, verbunden mit dem Auftreten sogenannter "Lampenbürsten-Chromosomen" (Callan, 1957; Gall und Callan, 1962). Insbesondere die "giant lampbrush chromosomes" in den Oozyten von Amphibien und die Transkription an ihren zahlreichen "lampbrush loops" sind eingehend untersucht worden (Zusammenfassung: Macgregor, 1980). Trotz der Menge des angesammelten Informationsmaterials ist wenig bekannt über die molekularen Mechanismen der Transkription an den Lampenbürstenschleifen, ihrer Regulation und der Prozessierung der Transkripte. Über die funktionelle Bedeutung der Lampenbürstenchromosomen in Hinblick auf die Differenzierungsprozesse in der Gametogenese existieren bis heute nur Spekulationen und Hypothesen. So faßt Macgregor (1980) zusammen:

"I would have wished to end this article by offering some new and conclusive explanation of the lampbrush phenomenon but ... I cannot do so ..."

Die Schleifenstrukturen des Y-Chromosoms in den Kernen primärer Spermatozyten von D. hydei enthalten nach histochemischen, autoradiographischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine DNA-Achse (Meyer, 1963; Hennig, 1967; Glätzer und Meyer, 1981), die von einer Matrix aus RNA und Proteinmaterial umgeben ist (Meyer und Hess, 1965; Hennig, 1967; Hess und Meyer, 1968). Sie entsprechen damit strukturell den Schleifen der Amphibien-Lampenbürstenchromosomen und stellen offensichtlich ebenfalls einen Zustand hoher Transkriptionsaktivität dar.

Diese Y-chromosomalen Funktionsstrukturen sind in Zellkernen anderer Gewebe nicht vorhanden, das Y-Chromosom ist dort heterochromatisch und damit genetisch weitgehend inaktiv. Es besitzt bis auf zwei rRNA-Gencluster (Schäfer und Kunz, 1975) und die Schleifenbildungsorte keine genetische Information und wird daher für die Entwicklung eines funk-

tionellen männlichen Somas nicht benötigt.

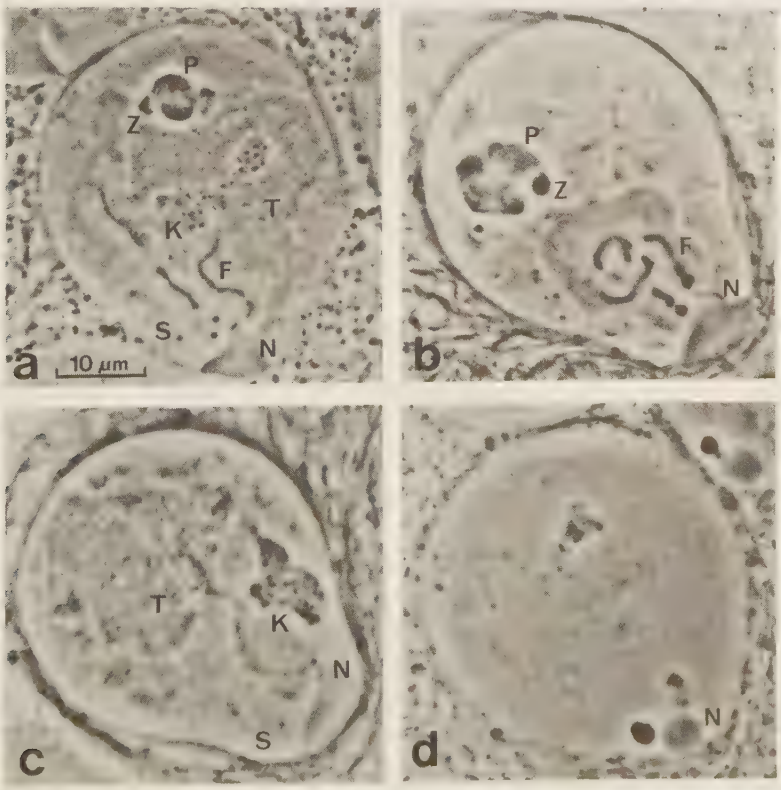
Es können durch genetische Manipulationen Tiere mit Defizienzen Y-chromosomaler Abschnitte oder ganz ohne Y-Chromosom hergestellt werden (Hess, 1967) ohne Einfluß auf Phänotyp und Vitalität der Männchen, allerdings sind sie steril. Abb. 2 zeigt die Strukturen in Kernen primärer Spermatozyten von Genotypen mit einem vollständigen Y-Chromosom bei Ausfaltung aller Lampenbürstenschleifen (Abb. 2a), mit Teilen des Y-Chromosoms und den entsprechenden, dort lokalisierten Schleifen (Abb. 2b, c) und ohne Y-Chromosom bei Abwesenheit sämtlicher Schleifen (Abb. 2d).

Die Bedeutung der Y-chromosomalen Schleifenstrukturen für Diffenzierungsprozesse männlicher Keimzellen ist zytogenetisch nachgewiesen: Nur bei Ausfaltung jeder einzelnen Lampenbürstenschleife in der meiotischen Prophase ist eine ungestörte Entwicklung von Spermatiden zu fertilen Spermien gewährleistet (Hess, 1967, 1970, 1974). Das Lampenbürstenstadium des Y-Chromosoms ist offenbar die sichtbare Manifestation seiner genetischen Aktivität und der kontrollierenden und regulierenden Funktion seiner Genprodukte im Ablauf der Spermatogenese.

Trotz dieser eindrucksvollen, fast greifbar erscheinenden Strukturen konnte durch molekulare Analysen - beispielsweise an X/Y- und X/O-Genotypen - bisher kein Y-Chromosom-spezifisches Material identifiziert werden. Sämtliches Ribonukleoprotein-Material der Lampenbürstenschleifen schien X-chromosomaler und autosomaler Herkunft und in X/Y-Genotypen lediglich mehrfach angereichert gegenüber X/O-Genotypen (Knust, 1979). Gelelektrophoretische Untersuchungen von RNA aus u.a. X/Y- und X/O-Männchen, in vivo markiert mit $^{3}H$ bzw. $^{14}C$ und eingesetzt in einem Doppelmarkierungsexperiment, zeigten bei direktem Vergleich kein eindeutiges Resultat (Schwochau und Mischke, unveröffentlicht). Hybridisierungsexperimente zur Identifizierung Y-spezifischer Transkripte

Abbildung 2:

Kerne primärer Spermatozyten von Drosophila hydei:
a: eines X/Y-Männchens mit allen Y-chromosomalen Schleifenstrukturen
b: eines X/A.$Y^{FP}$-Männchens mit den "Fäden" und dem "Peudonukleolus"
c: eines X/$Y^{S.KT}$-A-Männchens mit den "Schlingen", den "Keulen" und den "Tubulibändern"
d: eines X/O-Männchens ohne Schleifenstrukturen.
Phasenkontrast-Aufnahmen von Lebendpräparaten gequetschter Hoden in Drosophila Ringer (a, b und c von Prof. Schwochau freundlicherweise zur Verfügung gestellt). F: Fäden, K: Keulen, N: Nukleolus, P: Pseudonukleolus, S: Schlingen, T: Tubulibänder, Z: Zapfen.



waren erfolglos (Hennig, 1978). Y-Chromosom-spezifische DNA ist identifizierbar (Mischke, 1978), genetisch aktive Sequenzen konnten aber bislang nicht isoliert werden (Lifschytz, 1979; Vogt et al., 1982).

Somit ist molekular kein Material charakterisiert, das die auf der Basis der Resultate zytogenetischer Untersuchungen zu fordernde genetische Aktivität des Y-Chromosoms in der meiotischen Prophase bestätigt, und das auf seine Funktion in der Spermatogenese von Drosophila hindeutet.

In der vorliegende Arbeit wird durch Einsatz neuer Techniken die tatsächliche Existenz Y-spezifischer Transkripte demonstriert. Der Nachweis der Ablesung genetischer Information spezifisch für das Y-Chromosom in Abhängigkeit von der Bildung der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen liefert die molekulare Basis für weiterführende Untersuchungen der regulatorischen Funktion des Y-Chromosoms im Differenzierungsprozeß männlicher Gameten von D. hydei.

# II. MATERIAL UND METHODEN

## 1. Chemikalien und Enzyme

Actinomycin D: Boehringer, Mannheim

CsCl: Caesiumchlorid, Ultra Pure Reagent, Bethesda Research Laboratories, Neu-Isenburg

DBM-Papier: Enzobond RNA binding paper, Enzo Biochem, New York

Desoxy-adenosin-5'-triphosphat: Boehringer, Mannheim

2'-Desoxy-cytidin-5'-triphosphat: Boehringer, Mannheim

2'-Desoxy-guanosin-5'-triphosphat: Boehringer, Mannheim

Desoxy-thymidin-5'-triphosphat: Boehringer, Mannheim

DNA-Polymerase I: aus E.coli MRE 600, Boehringer, Mannheim

Eco RI: aus E.coli BS 5, Boehringer, Mannheim

Euparal: n 20°/D 1.535, Chroma Gesellschaft, Stuttgart

Formamid: Merck, destilliert über $Na_2CO_3$ (pH 7.0, 10-20 µS)

Giemsa stain: improved R66 solution, Gurr

Human Placenta DNA: P-L Biochemicals, Inc., Milwaukee

Lambda DNA: aus Bakteriophagen Lambda cI 1857 Sam 7, Boehringer, Mannheim

Lambda DNA-HindIII Fragments: Bethesda Research Laboratories, Neu-Isenburg

Micrococcus luteus DNA: Miles Laboratories, Frankfurt

Nitrocellulose: Membranfilter BA 85, Porendurchmesser 45 µm, Schleicher und Schüll, Dassel; Sartorius 11325

Oligo-d$(pT)_{12-18}$: Oligo-desoxy-thymidylsäure, Boehringer, Mannheim

Oligo-(dT) Cellulose: Sigma Chemie, München

Poly(U)-Sepharose 4B: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

Proteinase K: aus Pilzen, Merck, Darmstadt; vor der Verwendung vorinkubiert bei 37°C für 2-3 Stunden

Radiochemikalien:

Deoxy(8-$^3$H)Adenosine 5'-Triphosphate,

Deoxy(5-$^{3}$H)Cytidine 5'-Triphosphate,
Deoxy(8-$^{3}$H)Guanosine 5'-Triphosphate,
Deoxy(methyl-$^{3}$H)Thymidine 5'-Triphosphate,
(5-$^{3}$H)-Uridine, spezifische Radioaktivitäten: 15-30 Ci/mmol, Amersham Buchler, Braunschweig und New England Nuclear, Dreieich;
(Methyl-$^{3}$H)Polydesoxythymidylsäure, Miles Laboratories, Frankfurt

Ribonuklease A: Boehringer, Mannheim; vor der Verwendung vorinkubiert bei 8°C für 10 min

Rifampicin: $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, Boehringer, Mannheim

Schneider's Drosophila Medium: Grand Island Biol. Comp., Glasgow

Sucrose: Ultra Pure Reagent, Bethesda Research Laboratories, Neu-Isenburg

tRNA: aus Bierhefe, Boehringer, Mannheim

Uridin: Boehringer, Mannheim

Glasgeräte wurden mit 5% Dimethyldichlor-Silan in Benzol silikonisiert.

Alle Lösungensangaben in "%" sind, soweit nicht anders angegeben, als Gewichtsprozente (wt/wt) zu verstehen.

## 2. Abkürzungen und Symbole

| | |
|---|---|
| cpm | Zählwerte pro Minute |
| cDNA | komplementäre DNA |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dpm | Zerfälle pro min |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| Gardol | N-Lauroyl-Sarcosinat |
| min | Minuten |
| rDNA | ribosomale DNA |
| RNA | Ribonukleinsäure |

| | |
|---|---|
| RNP | Ribonukleoprotein |
| rpm | Rotorumdrehungen pro Minute |
| rRNA | ribosomale RNA |
| SDS | Natrium-Dodecylsufat |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tRNA | Transfer-RNA |

## 3. Drosophila hydei: Genetische Grundlagen

Die Untersuchungen wurden an Drosophila hydei durchgeführt. Die Tiere wurden bei 23°C auf einem Futterbrei, zubereitet aus Maisgries, Zuckerrübensirup, Malzzucker, Vollsojamehl, Trockenbierhefe, Agar und Wasser (Rezeptur: Hess, 1976), gezüchtet.

Folgende Stämme wurden verwendet:

1) Wildstamm mit den genetischen Konstitutionen X/X der Weibchen und X/Y der Männchen, seit 1961 im Labor gehalten.
2) Translokationsstämme KOM 290/2 und KOM 697/16 (Herstellung: Hess, 1967, 1968) mit den (Y;3) Translokationschromosomen $A.Y^{FP}$ und $Y^{S.KT}$-A, hergestellt durch Röntgenbestrahlung (Hess, 1964; Hess, 1965). Die Weibchen dieser Stämme - ihre genetischen Konstitutionen sind XX/$A.Y^{FP}$ bzw. XX/$Y^{S.KT}$-A - produzieren nach Kreuzung mit Wild-Männchen Söhne der Genotypen X/$A.Y^{FP}$ bzw. X/$Y^{S.KT}$-A.
3) Labor-Stamm Nr. 703/33 (Zucht: Prof. Hess) mit einer T(X;3) und 2 Y-Chromosomen in den Männchen und Stamm "white-mottled-1" mit dem Verbundchromosom $C(1)^2Tp(1)$ (=white-mottled-1-attached-X) in den Weibchen (konstruiert von Beck, 1976) zur Herstellung von XX/O-Genotypen (Schäfer, 1978). Die Kreuzung dieser XX/O-Weibchen mit Wildtyp-Männchen liefert männliche Nachkommen ausschließlich vom X/O-Genotyp.

## 4. Isolierung von Nukleinsäuren aus Fliegen durch CsCl-Dichtegradienten-Zentifugation

Die Prozeduren wurden exakt durchgeführt wie von Schwochau (1979) beschrieben. Bis zu 2 g (für die Isolierung hochmolekularer DNA bis zu 1 g) frische, für 48 Stunden gehungerte Fliegen wurden in einem silikonisierten Porzellanmörser unter flüssigem Stickstoff pulversisiert. Nach sofortiger Zugabe von 10.5-11.5 ml einer 60°C warmen Lösung (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.1 M NaCl, 0.03 M Mercaptoethanol, 1% Gardol, pH 7.9) mit entsprechend 0.5-1.0 mg Proteinase K und schneller Durchmischung erfolgte die Inkubation für 3-4 Stunden bei 50-53°C.

Die Isolierung und Trennung der Nukleinsäuren erfolgte in einer ersten CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation und die anschließende separate Reinigung von DNA und RNA mittels weiterer zwei bis drei CsCl-Gradienten. Zentrifugationsbedingungen waren 41000 rpm im VTi50-Rotor (Beckman) bei 20°C in einer Beckman L5-65 Zentrifuge für 36-40 Stunden (1. Lauf) bzw. 20-24 Stunden (2. bis 4. Lauf), die Ausgangsdichten der CsCl-Lösungen betrugen 1.65-1.72 $g/cm^3$. Am Ende der Zentrifugation wurde der Rotor ungebremst ab etwa 1000 rpm auslaufen gelassen, um eine vermischungsfreie Umschichtung der Gradienten zu gewährleisten.

Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte im ISCO Gradientenanalysator (Modell 640 mit UA5) durch Vermessung ihrer optischen Dichten bei 254 nm in einer 2mm Durchflußküvette mit einer Flußrate von 0.5 ml/min. DNA wurde über einen Dichtebereich von 1.65 bis 1.73 $g/cm^3$ isoliert, beinhaltend A+T-reiche Sequenzen, mitochondrielle DNA (Dichte 1.686 $g/cm^3$), Hauptbanden-DNA (Dichte 1.702 $g/cm^3$), G+C-reiche Sequenzen und zusätzlich isopyknisch nicht abtrennbare Polysaccharide (Dichte 1.677 $g/cm^3$).

Der Gewinn an DNA kann auf mehr als die doppelte Menge erhöht werden, indem das Fliegenhomogenat, vermischt mit CsCl-Lösung, vor der 1. Zentrifugation mit Ultraschall behandelt wird (pers. Mitteilung von Prof. Schwochau). Eine erhebliche Menge an DNA geht sonst mit dem chitinösen Material verloren.

Die Isolierung extrem hochmolekularer DNA (mit Moleklulargewichten von mehr als $10^8$ Dalton) war mittels der beschriebenen Methode (Schwochau, 1979) möglich, indem bei allen Arbeitsschritten ein statistisches Scheren der Moleküle durch mechanische Einwirkung vermieden wurde. Eine Analyse der CsCl-Gradienten im ISCO-System wurde nur nach der letzten Zentrifugation durchgeführt. Die Isolierung der DNA aus allen vorhergehenden Gradienten erfolgte manuell durch Absaugen bzw. Austropfen des Restgradienten und durch langsames Ausgießen der DNA-Lösung. Eine Vermischung mit zugegebener CsCl-Lösung vor den Zentrifugationen unterblieb, und der Rotor wurde langsam beschleunigend angefahren.

Die RNA wurde in den CsCl-Gradientenzentrifugationen auf die zentrifugale Wand der Röhrchen sedimentiert. Sie wurde in 0.05 M Tris-HCl, 1% Gardol, pH 7.4 gelöst und durch anschließende mehrmalige Zentrifugationen in CsCl-Gradienten gereinigt.

## 5. Isolierung von RNA aus Hodenanlagen und Hoden

Die Massenisolation der Hodenanlagen erfolgte in Anlehnung an die von Boyd (1976) für Speicheldrüsen beschriebene Methode. Zur Synchronisation von Larvenpopulationen wurde die Eiablage der Elterntiere auf etwa 40 Stunden begrenzt. Larven des dritten Entwicklungsstadiums wurden in einer Zuckerlösung (etwa 5%) vom Futterbrei getrennt (in Anleh-

nung an Mead, 1964) und gereinigt und anschließend mit einer speziell konstruierten Stahlrolle (Herstellung nach Anweisungen von Prof. Schwochau) auf einer Glasplatte gequetscht.

Die Organe wurden mit Drosophila Ringer (0.01 M Tris-HCl, 0.184 M KCl, 0.046 M NaCl, 0.003 M $CaCl_2$, pH 7.2) abgespült, mehrfach in Ringer gewaschen und die Hodenanlagen aus dem Sediment mit einer Pinzette in Schneider's Drosophila Medium überführt und gegebenenfalls für 20 Stunden bei 23°C inkubiert. Nach mehrmaligen Waschungen der Organe in Ringer und nachfolgendem Absaugen der Flüssigkeit wurden 1000-3000 Hodenanlagen in 1-3 ml eines für die weiteren Prozeduren geeigneten detergenzhaltigen Puffers mit 25-75 µg Proteinase K (vorinkubiert wie unter II.1. beschrieben) und etwa 25-100 µg tRNA für 2-3 Stunden bei 40°C lysiert.

Adulte Fliegen wurden in Drosophila Ringer präpariert und 500-1000 Hoden direkt überführt in 3-5 ml einer gepufferten detergenzhaltigen Lösung - geeignet für die entsprechende Weiterverarbeitung - mit 40-80 µg Proteinase K (vorinkubiert). Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Stunden bei 40°C wurde hochmolekulare DNA mechanisch geschert und anschließend ungelöstes Material sedimentiert durch Zentrifugation im Festwinkel-Rotor bei 15000 rpm für 3 min in einer Kühlzentrifuge.

## 5.1. Reinigung von RNA durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation

Die präparierten Organe wurden in 1.58 ml Lösung (0.05 M Tris-HCl, 1% Gardol, pH 7.4) mit Proteinase K und tRNA inkubiert (II.5.).

Das Lysat wurde mit 6.71 g einer gesättigten CsCl-Lösung in 0.1xSSC gemischt und in Polyallomer-Röhrchen (Quick Seal, Beckman) im VTi65-Rotor (Beckman) bei 50000 rpm und 15°C für 24 Stunden in einer Beckman L5-65 Zentrifuge zentrifugiert. Die auf die zentrifugale Röhrchenwand sedimentierte RNA wurde gelöst und mit Ethanol präzipitiert.

## 5.2. Isolierung von poly(A)-haltiger RNA

Die Fraktionierung von RNA erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie an poly(U)-Sepharose und oligo-(dT) Cellulose. Etwa 4-6 ml Gewebelysat in entsprechendem Bindungspuffer wurden bei 16-22°C viermal über die Säule gegeben. Bei Proben hoher Nukleinsäure- und Proteinkonzentration wurde von einem vorherigen Erhitzen der Probe abgesehen, da mehrfach unspezifische Komplexbildungen zu beobachten waren, die eine anschließende Trennung der Moleküle unmöglich machten. Nach ausgiebiger Waschung der Säule mit Bindungspuffer erfolgte die Elution der gebundenen poly(A)-haltigen RNA bei einer Temperatur von 65°C (Sepharose) bzw. 45°C (Cellulose) mit NaCl-freiem Elutionspuffer. Die RNA wurde mit Ethanol als Natriumsalz präzipitiert.

Poly(U)-Sepharose 4B wurde nach einer Rezeptur vorbehandelt, die durch Bindungstests mit $^{3}$H-Polyadenylsäure erarbeitet wurde und eine beobachtete unspezifische Retention dieser Sequenzen an der Sepharose verhindert. Das gequollene Material wurde mit 1 M Ethanolamin bei 45°C für 15 min deaktiviert, ausgiebig gewaschen, behandelt mit Proteinase K (vorinkubiert, siehe II.1.) und tRNA (je 5 µg/ml) in Säulenbindungspuffer (0.05 M Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 0.003 M EDTA, 0.3% SDS, pH 7.4) bei 45°C für 15 min und dann in Bindungspuffer äquilibriert. Die Probe wurde anschließend im gleichen Puffer aufgetragen. Der Elutionspuffer war 0.05 M Tris-HCl,

0.003 M EDTA, 0.3% SDS, pH 7.4. Die Menge von 1 g Sepharose ergab 4 ml Säulenvolumen mit einem Gehalt von 2 mg poly(U).

Oligo-(dT) Cellulose wurde in Elutionspuffer (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, 0.25% SDS, pH 7.4) gequollen. 500 mg Material ergaben ein Volumen von etwa 2 ml mit einer Bindungskapazität von 400-800 µg poly(A). Eine Vorbehandlung erfolgte mit 2 ml Elutionspuffer und 10 µg Proteinase K bei Raumtemperatur für 15 min. Nach anschließenden Waschungen mit Elutionspuffer wurde die Säule in Bindungspuffer (0.01 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.25% SDS, pH 7.4) äquilibriert und die Probe im gleichen Puffer aufgetragen.

### 5.3. Isolierung von RNA mittels Phenolextraktion

Für einen direkten analytischen Vergleich mit poly(A)-haltiger RNA wurden die isolierten Organe mit Proteinase K in Säulenbindungspuffer inkubiert (II.5., 5.2.).

Das Lysat wurde in Eis gekühlt und mit einem gleichen Volumen Phenollösung (bei 20°C gesättigte Phenollösung in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4) vermischt. Nach kurzer Zentrifugation (10 min bei 15000 rpm) zur Pasentrennung wurde die wässrige Phase entnommen, erhitzt auf 80°C für 2 min und die RNA mit Ethanol präzipitiert.

## 6. Restriktion von DNA

Hochmolekulare DNA aus Fliegen wurde durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationen gereinigt (II.4.) und die Hauptbande durch optische Vermessung der Gradienten bei 254 nm

(ISCO Gradientenanalysator) unter Abtrennung der Polysaccharide ausgeschnitten.

Die DNA wurde ausgiebig gegen Restriktionspuffer (0.05 M Tris-HCl, 0.02 M NaCl, 0.02 M $MgCl_2$, 0.005 M Mercaptoethanol, pH 7.8) dialysiert. Pro 100 µg DNA wurden 500 bis 900 Einheiten der Restriktionsendonuklease Eco RI (Boehringer, Mannheim) zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C für 3-5 Stunden wurden die Restriktionsfragmente mit Ethanol bei -20°C präzipitiert.

## 7. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Transfer auf Nitrocellulose-Filter oder DBM-Papier

### 7.1. Horizontale Agarose-Flachgele

Die Herstellung der Gele erfolgte nach Rezepturen von Schwochau (unveröffentlicht). Eine Agaroselösung von 0.8% oder 1% in Elektrophoresepuffer (0.036 M Tris, 0.034 M $NaH_2PO_4$, 0.001 M EDTA, 0.2% SDS, pH 7.6-7.8, nach Loening, 1968) wurde zwischen zwei Agaroseblöcke (2%) - sie schlossen die beiden Pufferreservoirs ab - zu einem 25x27 cm großen und 2 mm dicken Trenngel ausgegossen. Vor das Trenngel wurde ein 2 cm breites Gel mit 0.8% Agarose in 1:1 verdünntem Elektrophoresepuffer ("Prästartgel") gegossen, das durch Aufrechterhaltung dieser verminderten Ionenstärke eine Konzentrierung der Proben bei Eintritt in das Trenngel und damit eine Verschärfung der Banden bewirkt. Probenkammern wurden 2 mm breit und mehrere cm lang mit einer Rasierklinge an der Grenzlinie zwischen Trenn- und Prästartgel aus dem Prästartgel ausgeschnitten. Die Geloberfläche wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt.

Das Nukleinsäure-Präzipitat einer Ethanolfällung wurde in 60°C heißer Lösung von 0.2% Agarose in 1:3 verdünntem Elektrophoresepuffer aufgenommen, in die Probenkammern gegeben und bei 16°C geliert. Die Elektrophorese wurde mit einem Vorlauf bei niedriger Stromstärke begonnen, um eine optimale Bandenschärfung bei Eintritt in das Trenngel zu erreichen. Als Stromquelle diente ein Ortec 4100 Pulsed Constant Power Supply mit 300 Pulsen/min und 0.5 Discharge Capacitance. Die Elektrophorese wurde bei 16°C durchgeführt; die Stromleistungen waren 15 V x 5 mA für 3 Stunden und 45 V x 15 mA für 87-91 Stunden (bei DNA) bzw. 15 V x 5 mA für 2 Stunden und 50 V x 17 mA für 40 Stunden (bei RNA).

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 60-90 min in 2 Litern 1:2 verdünntem Elektrophoresepuffer ohne SDS (für DNA) oder destilliertem Wasser (für RNA) äquilibriert und anschließend in der gleichen Flüssigkeit mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) 30-45 min gefärbt. Das Gel wurde auf einer UV-Platte (UV Products Inc.) mit einer Polaroid MP-4 Land Kamera und einem Wratten 23 A Rotfilter photographiert (Film Polaroid Typ 665).

## 7.2. Transfer von DNA auf Nitrocellulose-Filter

Die im Gel nach Molekulargewichten getrennten DNA-Sequenzen wurden nach der Methode von Southern (1975) an Nitrocellulose-Filtern fixiert. Das Gel oder ausgeschnittene Bahnen wurden 15 min mit Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) und anschließend 30 min mit Neutralisiationslösung (0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.0) behandelt. Der Transfer auf Nitrocellulose-Filter erfolgte mit 20xSSC (1x SSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M Natriumcitrat) über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Filter 10 min in 2xSSC gewaschen, für 2 Stunden bei Raumtemperatur und für

8-14 Stunden bei 80°C getrocknet.

## 7.3. Transfer von RNA auf DBM-Papier

Die Teile des Gel, die zum Transfer eingesetzt werden sollten, wurden nach Abbruch der Elektrophorese nicht gefärbt, sondern in 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6.8 zweimal für 30 min gewaschen.

Die kovalente Bindung von RNA an DBM-Papier wurde durchgeführt nach einer Vorschrift von Enzo Biochem, Inc. in Anlehnung an Alwine et al. (1977). Aminobenzyloxymethyl-Papier (ABM) wurde in die aktive Diazobenzyloxymethyl-Form (DBM) überführt durch Behandlung mit 1.2 M HCl (0.3 ml pro $cm^2$ Papier) und 0.03% $NaNO_2$ für 30 min bei 0-4°C. Nach anschließenden Waschungen mit destilliertem Wasser (fünfmal für 5 min) und 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer (zweimal für 10 min) ebenfalls bei 0-4°C wurde das Papier sofort zum Transfer eingesetzt. Der Transfer der RNA - durchgeführt wie von Southern (1975) beschrieben - erfolgte bei 4°C in 0.2 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6.8 für mehrere Stunden oder über Nacht.

## 7.4. Vertikale Agarose-Flachgele

Das RNA-Präzipitat einer Ethanolfällung wurde in Anlehnung an Schwinghamer und Shepherd (1980) gelöst in 1:1 verdünntem Elektrophoresepuffer (0.036 M Tris, 0.034 M $NaH_2PO_4$, 0.001 M EDTA, 0.2% SDS, pH 7.6-7.8, nach Loening, 1968) mit 50% destilliertem Formamid und 6% Formaldehyd und denaturiert bei 65°C für 15 min. Anschließend wurde ein gleiches

Volumen einer 60°C heißen Lösung von 2% Agarose in 1:1 verdünntem Elektrophorese-Puffer mit 6% Formaldehyd zugegeben, die Lösung mit 10% Glycerin in die Probenkammern eines vertikalen Agarosegels gegeben, mit Elektrophoresepuffer überschichtet und bei Raumtemperatur geliert.

Aufgrund der Formamid-Konzentration von 22.5% hatte das Probengel mit 0.9% Agarose eine sehr weiche Konsistenz. Das Agarosegel war 20x25 cm groß, 2mm dick und wurde aus einer Lösung von 1.2% Agarose in Elektrophorese-Puffer mit 6% Formaldehyd hergestellt. Die Elektrophorese-Bedingungen waren 19 V, 5 mA für 1 Stunde und 60 V, 17 mA für 21 Stunden bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Ortec 4100 Pulsed Constant Power Supply mit 300 Pulsen/min und 0.5 Discharge Capacitance.

## 7.5. Transfer von RNA auf Nitrocellulose-Filter

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für den Transfer nach folgenden als optimal ermittelten Prozeduren vorbereitet: es wurde gewaschen in Elektrophorese-Puffer ohne SDS mit 6% Formaldehyd für 40 min und in 6xSSC, 6% Formaldehyd, 0.01 M $MgCl_2$ für 40 min. Der Transfer denaturierter RNA wurde durchgeführt in 6xSSC, 6% Formaldehyd, 0.01 M $MgCl_2$ bei Raumtemperatur über Nacht nach der Anordnung von Southern (1975).Anschließend wurden die Nitrocellulose-Filter sofort bei 80°C für 8-14 Stunden getrocknet.

## 8. Trennung von RNA durch Zonenzentrifugation und Fixierung an Nitrocellulose-Filtern oder DBM-Papier

### 8.1. Lineare Saccharose-Dichtegradienten

Die Trennung der RNA erfolgte wie von Schwochau (1979) beschrieben. Das Präzipitat wurde gelöst in 0.2 ml "6% Nexmed" (0.02 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.002 M EDTA, 4% Gardol, 2% SDS, pH 7.6), einem linearen Dichtegradienten mit 5-60% Saccharose in "Nexmed" (0.02 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.002 M EDTA, 2.5% Gardol, 1% SDS) überschichtet und im SW40Ti-Rotor (Beckman) in einer Beckman L5-65 Zentrifuge bei 40000 rpm und 1°C für 7-14 Stunden zentrifugiert.

Die Analyse und Fraktionierung der Gradienten erfolgte mittels eines ISCO-Gradientenanalysators (Modell 640 mit UA 5) in einer 2mm Durchflußküvette (Flußrate 0.3 ml/min) bei 254 nm. Fraktionen von 0.2 oder 0.3 ml wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und nach Zugabe von NaCl mit Ethanol gefällt.

### 8.2. Fixierung von RNA an Nitrocellulose-Filtern

RNA-Präzipitate von Ethanolfällungen wurden in je 20 µl Lösung mit 50% destilliertem Formamid und 6% Formaldehyd aufgenommen und bei 65°C für 15 min denaturiert. Anschließend wurden 80 µl einer Lösung von 2.5xSSC mit 6% Formaldehyd) auf eine Endkonzentration von 10% Formamid, 2xSSC und 6% Formaldehyd zugegeben.

Nitrocellulose-Rundfilter mit einem Durchmesser von 2.5 cm wurden auf einer Teflonfolie ausgelegt und die Proben auf-

getragen. Nach einer Trockenzeit von 2 Stunden wurden die Filter für 1 min in einer Lösung von 6xSSC, 6% Formaldehyd und 0.01 M $MgCl_2$ gespült, und anschließend bei 85°C für 12-16 Stunden getrocknet.

### 8.3. Fixierung von RNA an DBM-Papier

Die Diazotierung von ABM-Papier wurde durchgeführt nach Vorschriften von Enzo Biochem, Inc. und Alwine et al. (1977) wie unter II.5.3. beschrieben. 60 Rundfilter vom Durchmesser 1.6 cm wurden in 50 ml 1.2 M HCl mit 1.3 ml $NaNO_2$-Lösung (10 mg/ml) bei 0-4°C für 30 min aktiviert. Nach mehrmaligen eiskalten Waschungen mit destilliertem Wasser und 0.05 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 6.8 wurden die Filter kurz auf Saugpapier getrocknet und anschließend auf einer 5-8°C kalten Plexiglasscheibe ausgelegt.

Die RNA-Präzipitate von Ethanolfällungen wurden in je 40 µl 0.05 M Kaliumphosphat-Puffer gelöst und auf die Filter gegeben. Sie wurden 3 Stunden bei 16°C und 8-14 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

## 9. Hybridisierungen an Nitrocellulose-Filtern mit fixierter DNA

### 9.1. DNA/DNA-Hybridisierungen

Vor der Hybridisierung wurden die Filter je nach Größe in 200-300 ml 2xSSC, 0.25% SDS, 0.02% (wt/vol) je Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und Rinderserumalbumin (Denhardt, 1966) bei

65°C für 4-6 Stunden inkubiert. Die Filterstreifen wurden in feuchtem Zustand gerollt und in ein silikonisiertes Glasgefäß gegeben. Durch Verdrängung des inneren freien Raumes mittels eines geeigneten zweiten Gefäßes wurde das Volumen der Hybridisierungslösung sehr gering gehalten (1-4 ml, je nach Abmessungen und Anzahl der Filter).

Nach Zugabe der RNA- oder DNA-Probe in 2xSSC und 0.25% SDS erfolgte die Hybridisierung bei 65-67°C für etwa 40 Stunden. Die Filter wurden anschließend gewaschen in 2x SSC, 0.25% SDS bei 60-80°C, in 2xSSC, 0.25% SDS bei Raumtemperatur und in 2xSSC bei Raumtemperatur, jeweils zweimal für 10 min, dann in 70% Ethanol getaucht und getrocknet.

## 9.2. RNA/DNA-Hybridisierungen

Alle Prozeduren wurden durchgeführt wie unter II.9.1. beschrieben.

Anschließend an die Waschungen wurde eine Behandlung mit 1 mg Ribonuklease A (vorinkubiert wie in II.1. beschrieben) in 200 ml 2xSSC für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Filter wurden nochmals mit 2xSSC gespült, in 70% Ethanol getaucht und getrocknet.

# 10. Hybridisierungen an Filtern mit fixierter RNA

## 10.1. DNA/RNA-Hybridisierungen an Nitrocellulose-Filtern

Die Vorbehandlung der Nitrocellulose-Filter erfolgte in 70%

Formamid, 1xSSC, 0.25% SDS und je 0.02%-0.04% (wt/vol) Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und Rinderserumalbumin (Denhardt, 1966) bei 46°C für 2-3 Stunden. Die Filter wurden in einem silikonisierten Glasröhrchen mit einer DNA-Probe in 1xSSC, 70% Formamid und 0.25% SDS bei 46°C für 20-40 Stunden hybridisiert.

Die anschließenden Waschungen wurden zweimal mit 1xSSC, 70% Formamid und 0.25% SDS bei 46°C für 20 min, mit 2xSSC und 0.25% SDS zweimal bei 46°C, zweimal bei Raumtemperatur und einmal bei 60°C für jeweils 5 min und anschließend mehrmals mit 2xSSC bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Filter wurden mit 70% Ethanol gespült und getrocknet.

## 10.2. DNA/RNA-Hybridisierungen an DBM-Papier

DBM-Papier wurde vor der Hybridisierung zur Hydrolyse noch vorhandener reaktiver Diazogruppen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen deaktiviert (Alwine et al., 1977) in dem vorgeschriebenen Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 5xSSC, 0.25% SDS, 0.02% (wt/vol) je Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und Rinderserumalbumin) mit 1% Glycin bei 42°C für 6-14 Stunden oder in 70% Formamid, 1xSSC, 0.25% SDS und 0.02% (wt/vol) Ficoll, Polyvinylpyrrolidon, Rinderserumalbumin mit 1-2% Glycin bei 46°C für 6 Stunden.

Die Hybridisierung mit einer DNA-Probe erfolgte in 50% Formamid, 5xSSC, 0.25% SDS und je 0.02% (wt/vol) Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und Rinderserumalbumin bei 42°C bzw. in 70% Formamid, 1xSSC und 0.25% bei 46°C für 40 bzw. 20 Stunden. Es wurden silikonsisierte Glasgefäße verwendet. Filterstreifen wurden gerollt hineingegeben und der zylindrische Freiraum in der Mitte durch Einsatz eines zweiten Gefäßes verdrängt. Rundfilter waren in ihrer Größe identisch mit der

Grundfläche des Gefäßes.

Die anschließenden Waschungen wurden durchgeführt wie folgt: Im ersten Fall mit 2xSSC, 0.25% SDS zweimal für 15 min bei 42°C und zweimal für 15 min bei Raumtemperatur, dann viermal für 10 min mit 2xSSC bei Raumpemperatur. Im zweiten Fall zweimal für 15 min mit 70% Formamid, 1xSSC, 0.25% SDS bei 48°C, dann bei Raumtemperatur einmal mit 2xSSC, 0.25% SDS für 5 min und mehrmals mit 2xSSC.

## 11. Szintillationszählung

Zur Ermittlung der Radioaktivitätsverteilung auf den Filterstreifen wurden 2mm breite Querstreifen geschnitten. Rundfilter wurden für die Messungen nicht geteilt.

Nitrocellulose-Filter wurden in 70% Ethanol getaucht und in einem Szintillationscocktail (Instagel II, Packard) gelöst. DBM-Papier wurde im Tricarb Sample Oxidizer (Packard, Modell 306) verbrannt, wobei das Tritium als THO in den Cocktail Monophase-40 (Packard) überführt wurde. Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität jeder Probe erfolgte im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Modell 2650, Packard).

## 12. Zytologische Präparationen

### 12.1. Kerne primärer Spermatozyten aus Hoden

Hoden wurden in Drosophila Ringer (0.01 M Tris-HCl, 0.184 M KCl, 0.046 M NaCl, 0.003 M $CaCl_2$, pH 7.2) aus Fliegen

präpariert, Teile der Organe, die hauptsächlich Zellstadien in der meiotischen Prophase beinhalten, abgetrennt und in einem kleinen Tropfen Ringer auf einen Objektträger gegeben.

Der Hoden bzw. Hodenteil wurde gequetscht durch Auflegen eines silikonisierten Deckglases (18x18 mm) und Beklopfen des Deckglases mit einer Pinzette. Nach sofortigem Eintauchen des Objektträgers in flüssigen Stickstoff für etwa 10 Sekunden wurde das Deckglas mit einer Rasierklinge abgehoben, das Präparat für mindestens 2 min in absolutem Ethanol fixiert und luftgetrocknet.

## 12.2. Polytäne Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen

Speicheldrüsen wurden in Drosophila Ringer aus Larven des dritten Entwicklungsstadiums präpariert und für 10-20 min in 45% Essigsäure fixiert. Sie wurden in je einem Tropfen Essigsäure auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckglas (18x18 mm, nicht silikonisiert) bedeckt.

Das Gewebe wurde mazeriert durch Beklopfen des Deckglases mit einer Pinzette und der Grad der Chromosomenspreitung im Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet. Nach folgender starker Quetschung wurde der Objektträger sofort in flüssigen Stickstoff getaucht, das Deckglas mit einer Rasierklinge abgehoben und das Präparat für 3-5 min in 96% Ethanol fixiert und luftgetrocknet.

## 12.3. Metaphase-Chromosomen aus larvalen Ganglien

Ganglien, bestehend aus dorsalem und ventralem Teil, wurden

in Drosophila Ringer aus Larven des dritten Entwicklungsstadiums präpariert und in Schneider's Drosophila Medium gesammelt. In Anlehnung an die Vorschrift von Cobel-Geard und Gay (1980) wurden anschließend pro ml Medium 8 µl Kolchizin-Lösung (100 µg Colcemid/ml) auf eine Endkonzentration von 0.8 µg/ml zugegeben. Nach Durchmischung mit dem Medium wurde für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Ganglien wurden in eine Lösung von 1% Natriumcitrat überführt - die Neuroblasten schwollen in diesem hypotonischen Medium an - , die nach 10 min abgesaugt und durch einen Tropfen 50% Essigsäure ersetzt wurde. Nach 5 min Fixierung wurde ein Deckglas (18x18 cm, nicht silikonisiert) aufgelegt, das Gewebe vorsichtig mazeriert und dann gequetscht.

Der Objektträger wurde sofort in flüssigen Stickstoff getaucht und das Deckglas mit einer Rasierklinge abgehoben. Die Fixierung der Präparate erfolgte für 10-14 Stunden in 96% Ethanol bei 0-4°C.

## 13. "In situ"-Hybridisierungen

### 13.1. Vorbehandlung der Präparate

Präparationen von Mitosechromosomen aus Ganglien wurden nach Rezepturen von Pardue und Gall (1975) mit einer Lösung von 100 µg Ribonuklease A (vorinkubiert wie beschrieben unter II.1.) pro 1 ml 2xSSC bei 37°C für 1 Stunde inkubiert und anschließend dreimal mit 2xSSC bei Raumtemperatur, zweimal in 70% und einmal in 96% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die Denaturierung der DNA erfolgte mit 0.07 N NaOH für 3 min bei Raumtemperatur, anschließende Waschungen wur-

den in 70% und 96% Ethanol jeweils zweimal für 5 min durchgeführt. Die Präparate wurden luftgetrocknet.

Präparate von Speicheldrüsen-Chromosomen und Spermatozytenkernen wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung fixiert mit 3.7% Formaldehyd in Drosophila Ringer bei Raumtemperatur für 10 bzw. 15 min, anschließend viermal für 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen und sofort einer Proteinase-Behandlung unterworfen mit 1 µg Proteinase K (vorinkubiert) pro 1 ml 0.01 M Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 7.4 bei 16°C für 3 bzw. 5 min. Die Präparate wurden mit destilliertem Wasser viermal für 2 min gewaschen und luftgetrocknet.

Präparate von polytänen Chromosomen wurden für DNA/DNA-Hybridisierungen nachfolgend mit NaOH behandelt wie oben beschrieben.

Als Kontrollen wurden einige Präparate mit 5 µg Ribonuklease A/ml 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4 bei 37°C für 60 bzw. 45 min inkubiert, dann dreimal für 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Entfernung noch anhaftender RNase-Moleküle, die zu einer unspezifischen Bindung von DNA aus der Probe führen können, folgte eine Behandlung mit Proteinase K (1 µg /ml 0.01 M Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 7.4) bei 16°C für 1 min. Die Objektträger wurden mit destilliertem Wasser viermal für 2 min gewaschen und luftgetrocknet.

## 13.2. Experimenteller Aufbau

Die Ausführung der Hybridisierungsexperimente erfolgte unter Einsatz apparativer Aufbauten, die nach Ideen von Prof. Schwochau entwickelt wurden. Die Objektträger wurden in einer Feuchtkammer über mehreren Petrischalen mit Hybridisierungslösung waagerecht angeordnet. Jedes Präparat wurde mit

1 mm hohen Teflonstreifen eng umrandet und die DNA-Probe (30-50 µl) in ihre Mitte unter ein silikonisiertes Deckglas (10x10 oder 18x18 mm, je nach Objektgröße) pipettiert, wobei Luftblasen innerhalb dieses Reaktionsraumes zwischen Objekt und Deckglas zu vermeiden waren.

Die Feuchtkammer wurde dicht verschlossen und im Wasserbad für 40 Stunden bei konstanter Temperatur gehalten.

## 13.3. DNA/DNA-Hybridisierung

DNA/DNA-Hybridisierungen wurden nach Pardue und Gall (1975) in 2xSSC bei 69°C für 40 Stunden durchgeführt.

Die anschließenden Waschungen erfolgten viermal für 5 min in 2xSSC bei 65°C, einmal für 5 min in 0.2xSSC bei 60°C, zweimal für 2 min in 70% Ethanol und einmal für 2 min in absolutem Ethanol.

## 13.4. DNA/RNA-Transkripthybridisierung

DNA/RNA-Hybridisierungen wurden in Anlehnung an Macgregor und Andrews (1977), Morgan et al. (1980) und Varley et al. (1980) in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C oder nach Schwochau und Herrnstadt (1982) in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C durchgeführt.

Nach 40 Stunden wurden die Deckgläser in Hybridisierungslösung abgeschwemmt und die Präparate wie folgt gewaschen: nach Hybridisierung in 4xSSC und 50% Formamid zweimal für 15 min in 2xSSC bei 65°C, zweimal für 10 min in 2xSSC bei

Raumtemperatur, einmal in 50% Ethanol, zweimal in 70% Ethanol und einmal in 96% Ethanol für je 2 min, exakt durchgeführt nach den zitierten Vorschriften; nach Hybridisierung in 1xSSC und 70% Formamid zweimal für 30 min in 1xSSC und 70% Formamid bei 48°C, dreimal für 5 min in 2xSSC bei Raumtemperatur, einmal für 5 min in 2xSSC bei 60°C und in Ethanol wie oben beschrieben.

## 13.5. Schmelzanalyse von DNA/RNA-Hybriden

Die DNA/RNA-Hybridisierung mit einer entsprechenden DNA-Probe erfolgte in 1xSSC und 70% Formamid bei 36°C für 40 Stunden. Eine "Schmelzkurve" wurde anschließend durch Abschmelzen der DNA von den Präparaten in Temperaturschritten von 3°C erstellt. Die Deckgläser wurden in Hybridisierungslösung bei 36°C abgeschwemmt, die Präparate für insgesamt 1.5 Stunden in gleicher Lösung bei 36°C gewaschen und einzelne Objektträger in 1xSSC und 70% Formamid bei höheren Temperaturen von 39-75°C für 10 min inkubiert. Anschließende Waschungen mit 2xSSC erfolgten dreimal für 5 min bei Raumtemperatur, einmal für 5 min bei 60°C und mit Ethanol wie unter II.13.4. beschrieben.

Eine zusätzliche Nachfixierung der Präparate sollte ein Ablösen hybridisierter DNA-Moleküle beim Beschichten mit 45°C warmer Photoemulsion von den "36°C"- bis "45°C"-Präparaten verhindern. Die Fixierung wurde in 2x SSC mit 3.7% Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur für alle Präparate durchgeführt, um identische Prozeduren und vergleichbare Resultate zu gewährleisten. Anschließend wurden die Objektträger mehrmals mit Ethanol wie beschrieben gespült und luftgetrocknet.

## 14. Autoradiographie und zytologische Färbungen

Die Objektträger wurden in "subbing solution" (0.5% Gelatine und 0.05% Kaliumchromsulfat) bei 20°C getaucht und senkrecht getrocknet. Diese Behandlung ermöglichte das anschließende Aufziehen einer dünnen und fest haftenden Schicht Photoemulsion. Sie erfolgte erst zu diesem Zeitpunkt, da die Gelatine sich bei Hybridisierung in Formamid-haltigem Medium auflöst und das Präparat vom Objektträger abschwemmt.

Die anschließende Beschichtung mit Photoemulsion (Kodak NTB-2, 1:1 verdünnt) bei 45°C wurde durchgeführt wie von Pardue und Gall (1975) beschrieben. Die trockene Filmschicht wurde mit Wasserstoffperoxid-Gas behandelt zur Reduktion der Zahl von Background-Silberkörnern. Nach Exposition bei 4°C wurden die Objektträger entwickelt in Kodak D-19 (1:1 verdünnt) bei 16°C für 2.5 min, kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und fixiert für 5-6 min in Agfa Acidofix. Die Objektträger wurden mehrmals für insgesamt 10 min mit destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet.

Die Präparationen der polytänen Chromosomen wurden nach Pardue und Gall (1975) in 0.01 M Natriumphosphat-Puffer, pH 6.8 mit 1 ml Giemsa stain pro 30 ml Puffer für 30-60 min gefärbt, anschließend kurz in destilliertes Wasser getaucht und getrocknet.

Die Spermatozytenkerne wurden nach Yamasaki (1977, 1981) mit Giemsa stain in einem Borat-Puffer (0.2 M Natriumborat, 0.2 M KCl, 0.2 M $Na_2CO_3$, pH 10.0 ) gefärbt. Bei einer Menge von 0.3 ml Giemsa/10 ml 1:3 verdünntem Puffer betrug die Färbezeit 6-8 Stunden mit einmaligem Wechsel der Lösung. Nach kurzem Spülen der Präparate mit destilliertem Wasser wurden sie getrocknet.

Metaphase-Chromosomen wurden mit Karmin in 50% Essigsäure

für 5-15 min gefärbt, in destilliertem Wasser gespült und getrocknet.

Die trockenen Präparate wurden mit Euparal eingedeckt.

## 15. Technik der Nicktranslation

Die radioaktive Markierung von DNA mit Tritium mittels "Nicktranslation" erfolgte in Anlehnung an Vorschriften von Maniatis (1975) und Macgregor und Mizuno (1976) unter Anwendung optimierter Reaktionsbedingungen.

10 µg DNA wurden inkubiert in 100 µl Reaktionsvolumen mit 50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Mercaptoethanol, pH 7.8, 5 µg Rinderserumalbumin, 50-75 Einheiten DNA-Polymerase I (Kornberg Polymerase) und jeweils 5-10 nmol - entsprechend 1.8-3.6 µg eingebautem Material bzw. 3-6 µg Vorstufen - radioaktiv markiertes dATP, dCTP, dGTP und dTTP (spezifische Aktivitäten: 10-30 Ci/mmol; Molekulargewichte: 490-570 Dalton) bei 16°C für 10-12 Stunden. Um einen weitgehenden Umsatz der DNA mit radioaktiven Vorstufen und damit hohe spezifische Radioaktivitäten zu erzielen, waren radioaktiv markierte Desoxyribonukleotid-Triphosphate in einer etwa äquimolaren oder sogar überschüssigen Menge und in konzentrierter Lösung mit hoher Enzymaktivität einzusetzen.

Die Reaktion wurde beendet durch eine Behandlung mit 5 µg Proteinase K (vorinkubiert) bei 50°C für 2 Stunden in 2 ml detergenzhaltiger Lösung (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.1 M NaCl, 1% Gardol oder SDS, pH 7.9) mit einem 100fachen Überschuß an unmarkierten Desoxytriphosphaten. Die DNA wurde gereinigt durch eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation im VTi50-Rotor bei 41000 rpm und 20°C für 20-24 Stunden und mittels optischer Vermessung bei 254 nm (ISCO Gradienten-

analysator) fraktioniert. Nach anschließender Dialyse gegen 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 wurde die DNA als Natriumsalz mit Ethanol präzipitiert.

Geringe DNA-Mengen wurden nicht durch CsCl-Gradienten-Zentrifugation gereinigt, sondern unter Zugabe von 40-60 µg Lambda-DNA mit Ethanol zweimal als Ammoniumsalz aus 3.3 M Ammoniumacetat-Lösung und anschließend als Natriumsalz aus 0.2 M NaCl-Lösung präzipitiert.

## 16. Herstellung von $^{3}$H-cDNA

Der Herstellung radioaktiv markierter einsträngiger "complementary" DNA erfolgte in Anlehnung an eine Rezeptur der Bethesda Research Laboratories für "AMV RNA-dependent DNA Polymerase". Die Reaktionslösung war 0.1 M Tris-HCl, 0.01 M $MgCl_2$, 0.05 M KCl, pH 8.3, 0.02 M Dithiothreitol, 50 µg Actinomycin D/ml und 1 mM je dATP, dCTP, dGTP und dTTP, davon je ein zehntel radioaktiv markiert mit Tritium (spezifische Aktivitäten: 10-30 Ci/mmol). 10 µg RNA wurden in 250 µl der Lösung mit 5 µg oligo-$d(pT)_{12-18}$ als template primer und 1300 Einheiten "Reverse Transcriptase" (erhalten von Prof. Beard) bei 37°C für 90 min inkubiert.

Die Reaktion wurde beendet durch Hydrolyse der RNA in etwa 2 ml 0.1 N NaOH bei 80°C für 5 min, wobei bereits Lambda-DNA als Carrier für die anschließende Fällung zugegeben war. Die Lösung wurde mit HCl neutralisiert, die DNA als Ammoniumsalz (aus 3.3 M Ammoniumacetat-Lösung) und als Natriumsalz (aus 0.2 M NaCl-Lösung) je zweimal mit doppeltem Volumen Ethanol bei -20°C präzipitiert. Es folgte eine nochmalige Behandlung in 0.03 N NaOH bei 80°C für 1 min mit anschließender Neutralisation und Ethanolfällung.

Dieses Rezept der cDNA-Synthese lieferte - je nach spezifischer Aktivität der eingesetzten Triphosphate - ein Produkt mit einer spezifischen Radioaktivität von $2\text{-}6\text{x}10^6$ dpm $^3$H/µg cDNA.

## 17. Radioaktive Nukleinsäuren als Proben für Hybridisierungen

Die DNA-Proben wurden hergestellt wie im folgenden beschrieben. Die Präzipitate von Ethanolfällungen wurden in Vorbereitung für Hybridisierungen in 1 N NaOH gelöst und für 1 min auf 80°C erhitzt, in Eis abgekühlt und mit HCl neutralisiert. Anschließend wurden je nach Hybridisierungsbedingungen Formamid und/oder SSC, für Filterhybridisierungen zusätzlich SDS und eventuell Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und Rinderserumalbumin auf eine entsprechende Endkonzentration zugegeben. Die Probe wurde nochmals denaturiert bei 80°C für 2 min, in Eis abgekühlt und zur Hybridisierung eingesetzt.

RNA-Proben, ebenfalls mit Ethanol präzipitiert, wurden in einem entsprechenden Volumen 2xSSC, 0.25% SDS gelöst und durch mehrere Lagen Nitrocellulose-Membranen filtriert.

### 17.1. Genom-DNA der X/Y-Konstitution

Hochmolekulare DNA aus X/Y-Fliegen wurde durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationen gereinigt (II.4.), über einen Dichtebereich von 1.65-1.73 g/cm$^3$ in CsCl isoliert und gegen 3-5 Liter 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4 in mehreren Wechseln für insgesamt 2 Stunden dialysiert. Eine Fraktion aus dem Gra-

dienten mit einem Dichtebereich um 1.68 g/cm$^3$ wurde dabei separat gehalten und anschließend zur Entfernung der Polysaccharide im Ti75-Festwinkelrotor (Beckman) bei 20°C in einer Beckman L5-65 Zentrifuge für 15 min bei 50000 rpm zentrifugiert. Die Polysaccharide waren sedimentiert, die DNA blieb quantitativ in Lösung.

Sämtliche DNA-Fraktionen wurden vereinigt und mit NaCl und Ethanol präzipitiert. Diese Gesamt-DNA-Präparation wurde "nicktransliert" (II.15.) zu spezifischen Radioaktivitäten von 2.4-7.8x10$^7$ dpm $^3$H/µg DNA. Vor der Hybridisierung wurde eine entsprechende Menge radioaktiv markierter X/Y-DNA zusammen mit einer 1000fachen Menge an unmarkierter DNA aus Micrococcus luteus oder E. coli (freundlicherweise von Dr. Bunemann zur Verfügung gestellt) beschallt, denaturiert, abermals beschallt und präzipitiert wie unter II.17.2. beschrieben.

## 17.2. Y-Chromosom-spezifische DNA

Mittels "Nicktranslation" (II.15.) radioaktiv markierte DNA aus X/Y-Fliegen (II.17.1.) wurde versetzt mit einem 2000- bis 10000fachen Überschuß einer unmarkierten Gesamt-DNA-Präparation (Dichtebereich 1.65-1,73 g/cm$^3$ in CsCl) aus X/O- und/oder X/X-Fliegen bzw. aus X/A.Y$^{FP}$- oder X/Y$^{S.KT}$-A-Männchen, isoliert durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationen (II.4.).

In Vorbereitung für die Hybridisierung wurden diese DNA-Proben im Eisbad bei 100 Watt (Labsonic 1510 mit einer 4mm Nadelsonde, Braun, Melsungen) für 2-3 min mit Ultraschall behandelt und präzipitiert. Sie wurde gelöst in 1 N NaOH, denaturiert bei 80°C für 2 min, neutralisiert mit HCl, anschließend erneut beschallt und mit Ethanol präzipitiert.

## 17.3. Y-Chromosom-spezifische RNA

Die Herstellung radioaktiv markierter RNA erfolgte in vivo durch Zugabe radioaktiver Vorstufen. 1000-2000 Hodenanlagen wurden in Schneider's Drosophila Medium mit 5 µg Rifampicin/ml (Schwochau, pers. Mitteilung) zur Hemmung von bakteriellem Wachstum und 25-27 µCi $^{3}$H-Uridin (spezifische Aktivität: 20 Ci/mmol) für 20-24 Stunden bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden die Organe ausgiebig in Drosophila Ringer unter Zugabe einer 100fachen Menge an unmarkiertem Uridin gewaschen und mit 25-50 µg Proteinase K (vorinkubiert) und 50-100 µg tRNA in 1-3 ml Lösung (0.05 M Tris-HCl, 1.5% SDS, pH 7.4) bei 40°C für 2-3 Stunden inkubiert, für 2 min auf 80°C erhitzt, dann abgekühlt und mit NaCl und Ethanol präzipitiert.

RNA wurde aus X/O-Fliegen isoliert und durch drei CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationen gereinigt (II.4.). Sie wurde zusammen mit der radioaktiv markierten RNA in 0.05 M Tris-HCl, 1.5% Gardol, pH 7.4 aufgenommen und in CsCl-Lösung einer Dichte von 1.65 g/cm$^3$ für 40 Stunden bei 41000 rpm und 20°C im VTi50 Rotor zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde gelöst und mit Ethanol präzipitiert.

## 17.4. Ribosomale DNA

Drosophila hydei rDNA, kloniert im dem Vektor pBR 322, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Kunz zur Verfügung gestellt. Das Plasmid enthielt alle Sequenzen einer "rDNA repeat unit" ohne intervenierende Sequenz: 18S- und 28S-rRNA codierende Regionen, NTS ("non transcribed spacer") und ITS ("internal transcribed spacer").

Die DNA wurde in einer CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation (VTi50-Rotor, 24 Stunden bei 41000 rpm und 20°C) gereinigt. Die radioaktive Markierung mittel "Nicktranslation" erfolgte wie beschrieben (II.5.). Die spezifische Radioaktivität war $4x10^7$ dpm $^3H/\mu g$ DNA. Die radioaktiv markierte rDNA-Probe, versetzt mit Lambda-DNA, wurde zur Hybridisierung vorbehandelt durch Denaturierung und mehrmaliges Beschallen wie beschrieben (II.17.2.) und anschließend mit Ethanol präzipitiert.

## 17.5. cDNA vom 38S-rRNA-Precursor

38S-RNA-Precursormoleküle für die 5.8S- 18S- und 28S-rRNA in Drosophila hydei wurden nach einer Vorschrift von Schwochau (unveröffentlicht) in Anlehnung an Kirby (1959, publiziert in: Hennig et al., 1971) isoliert. 5 g Fliegen wurden im Eisbad mit einem VIRTIS Homogenisator (Cenco Instrumenten) mit rotierenden Messern für 5 min bei 20000 rpm und für 10 min bei 4500 rpm homogenisiert. Die Homogenisationslösung enthielt 30 ml 0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 20 ml Phenolreagenz (500 g Phenol, 70 ml destilliertes m-Kresol, 0.5 g 8-Hydroxychinolin und 55 ml destilliertes Wasser), 150 mg SDS und 2.5 ml einer Benonit-Suspension (50 mg/ml Wasser). Nach Zentrifugation (15000 rpm für 10 min) zur Phasentrennung wurde die wässrige Phase entnommen und noch dreimal mit Phenollösung (gesättigt bei 20°C in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4) vermischt. Anschließend wurde sie mit NaCl versetzt und die RNA mit Ethanol präzipitiert.

Das Präzipitat wurde in 2 ml "6% Nexmed" (0.02 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.002 M EDTA, 4% Gardol, 2% SDS, pH 7.6) gelöst und in zwei linearen Dichtegradienten mit 5-60% Saccharose in "Nexmed" (0.02 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.002 M EDTA, 2.5% Gardol, 1% SDS) aufgetrennt durch Zentrifugation im VTi50-

Rotor bei 50000 rpm und 1°C für 90 min (Schwochau, 1979). Der Rotor wurde mit Hilfe eines SAA-Zusatzes (Beckman) mit niedriger Beschleunigungsstufe angefahren und am Ende des Laufes bis ca. 1000 rpm abgebremst und dann frei auslaufen gelassen, um eine langsame Umschichtung der Gradienten zu gewährleisten. Die Analyse und Fraktionierung der Gradienten erfolgte bei 254 nm im ISCO-Gradientenanalysator. Berechnungen von S-Werten wurden anhand der von McEwen (1967) erstellten Formeln und Tabellen durchgeführt.

Die Fraktion der 38S-rRNA wurde in zwei folgenden Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugationen im SW40Ti-Rotor gereinigt (II.8.1.) und poly(A)-haltige RNA mittels poly(U)-Sepharose entfernt (II.5.2.). Die Synthese von komplementärer DNA erfolgte wie beschrieben (II.16.).

## 17.6. cDNA Y-spezifischer Transkripte

Poly(A)-haltige RNA aus Hoden des Genotyps $X/A.Y^{FP}$ wurde durch Zonenzentrifugation in Saccharose-Dichtegradienten gereinigt und getrennt (II.8.), insgesamt dreimal mit NaCl und Ethanol präzipitiert und anschließend zur Synthese von cDNA, durchgeführt wie beschrieben (II. 16.), eingesetzt.

Zur Hybridisierung wurde je Probe ein 10000facher Oberschuß einer unmarkierten Gesamt-DNA-Präparation (Dichtebereich 1.65-1.73 $g/cm^3$ in CsCl) (II.4.) aus X/X-Fliegen zugegeben. Die Proben wurden denaturiert und beschallt wie unter II. 17.2. beschrieben.

17.7. Poly(dT)

Radioaktive Polydesoxythymidylsäure (spezifische Aktivität: 17.4 µCi/µmP, etwa $1.2 \times 10^5$ dpm $^3H$/µg) wurde in 50% Ethanol eingedampft und zur Hybridisierung in entsprechender Lösung aufgenommen.

# III. NUKLEINSÄURE-HYBRIDISIERUNGEN: TECHNIKEN, REAKTIONSBEDINGUNGEN UND RESULTATE

## 1. Herstellung einer DNA-Probe zur Identifizierung Y-spezifischer Sequenzen

Für eine Analyse Y-chromosomaler Transkripte mittels eines DNA/RNA-Hybridisierungsexperimentes steht bis heute keine isolierte DNA zur Verfügung, die Y-chromomaler Herkunft, dabei auch Y-spezifisch ist und gleichzeitig in der männlichen Keimbahn von D. hydei transkribiert wird (Lifschytz, 1979; Vogt et al., 1982). Daher wurde eine DNA-Probe hergestellt, die zur Identifizierung ausschließlich Y-spezifischer Sequenzen - d.h. von Sequenzen, die auf dem X-Chromosom und den Autosomen nicht existieren - führen und die gleichzeitig eine Erfassung aller Sequenzen dieser Spezifität ermöglichen sollte.

Gesamt-DNA aus D. hydei X/Y-Fliegen, isoliert über einen Dichtebereich von 1.65-1.73 $g/cm^3$ in CsCl, wurde mittels "Nicktranslation" radioaktiv markiert und versetzt mit einem 2000- bis 10000fachen Überschuß an unmarkierter DNA aus D. hydei X/O- oder X/X-Fliegen. Als Folge der kompetitiven Unterdrückung aller radioaktiv markierten X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen durch komplementäre unmarkierte Moleküle konnten in einem Hybridisierungsexperiment nur die nicht kompetierten Y-spezifischen Sequenzen ein Signal ergeben. Durch Zugabe großer Mengen an unmarkierter DNA aus X/A.$Y^{FP}$- oder X/$Y^{S.KT}$-A-Genotypen war eine Untersuchung von Sequenzen spezifisch für Teile des Y-Chromosoms möglich.

## 2. Artefakte in "in situ"-Hybridisierungen

### 2.1. "In situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung ohne Ausschluß von DNA/DNA-Wechselwirkungen

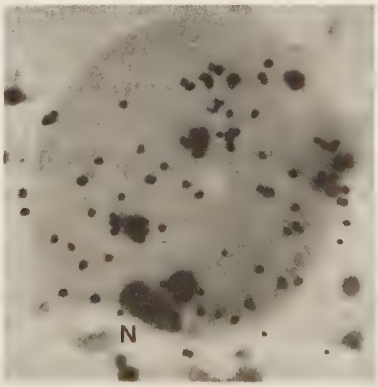
Die Technik der "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung wurde von Pukkila (1975) eingeführt und seitdem weltweit angewandt zur Identifizierung von naszierenden Transkripten mit Sequenzhomologien zur eingesetzten DNA-Probe. Sie scheint zum Nachweis bisher nicht erfaßter Y-spezifischer Transkripte besonders geeignet: Filterhybridisierungsexperimente führten zu keinen Resultaten, die eine Charakterisierung oder Isolierung Y-spezifischer RNA erlaubt hätten. Wäre die Ursache hierfür eine extreme Größe der Transkripte, ihr schnelles Processing und/oder die Existenz einer RNA-Population sehr heterogener Molekulargewichte, so sollte der Einsatz der "in situ"-Hybridisierungstechnik die Identifizierung solcher Sequenzen ermöglichen.

Das Experiment einer "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung wurde durchgeführt unter allgemein angewendeten Hybridisierungsbedingungen (Macgregor und Andrews, 1977; Morgan et al., 1980; Varley et al., 1980) in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C. Eine "Y-spezifische" DNA-Probe (radioaktiv markierte X/Y-DNA mit einem 2000fachen Überschuß an unmarkierter X/O-DNA (IV.9., 10.)) wurde zunächst - als Kontrolle - hybridisiert auf Kerne primärer Spermatozyten des Genotyps X/O ohne Y-Chromosom.

Dieses Experiment zeigt als Resultat nach Autoradiographie und Färbung eine selektive Markierung der Spermatozytenkerne (Abb. 3), die nicht hätte auftreten dürfen. Die Silberkörner waren meist über anfärbbaren RNP-Strukturen im Kernraum zu finden. Diese Hybridisierung konnte durch Erhöhung der Menge an kompetierender X/O-DNA auf einen 10000fachen Überschuß

Abbildung 3:

D. hydei X/O-Spermatozytenkern nach Hybridisierung in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C für 40 Stunden mit $8x10^5$ dpm pro Präparat einer DNA-Probe bestehend aus Gesamt-DNA von X/Y-Fliegen, radioaktiv markiert mittels Nicktranslation (spezifische Aktivität: $3.6x10^7$ dpm $^3H/\mu g$), und einem 2000-fachen Überschuß an kompetierender unmarkierter Gesamt-DNA aus X/O-Tieren.
Lichtmikroskopische Aufnahme des Autoradiogramms nach 2 Wochen Exposition und Giemsa-Färbung. N: Nukleolus.



nicht beeinflußt werden, ebensowenig duch intensive Beschallung der DNA auf eine durchschnittliche Molekülläng von 300 Nukleotiden oder durch mehrstündige Reassoziierung der DNA-Probe vor Einsatz zur Hybridisierung, um eine Reaktion radioaktiver X-chromosomaler und autosomaler Sequenzen mit komplementären unmarkierten Molekülen zu ermöglichen.

Das Resultat dieses Experimentes bedeutet, daß die für Transkripthybridisierungen etablierten Bedingungen unkontrollierte Reaktionen zwischen den Nukleinsäuren erlauben und somit die Produktion eindeutiger Daten unmöglich machen.

## 2.2. Unkontrollierbare Reaktionen in "in situ"-DNA/DNA-Hybridisierungen

Ein DNA/DNA-Hybridisierungsexperiment wurde durchgeführt unter Standardbedingungen (Pardue und Gall, 1975) in 2xSSC bei 69°C mit einer identischen "Y-spezifischen" DNA-Probe an polytänen Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen (Abb. 4). Die Chromosomen zeigen über ihre ganze Länge eine intensive Markierung mit Silberkörnern, obwohl aus der eingesetzten DNA-Probe nur die für das Y-Chromosom spezifischen Sequenzen ein Signal ergeben sollten. Das heterochromatische Y-Chromosom befindet sich im Chromozentrum, nur die Autosomen und der euchromatische Teil des X-Chromosoms liegen als polytäne Riesenchromosomen vor. Eine Erhöhung der Menge an auskompetierender unmarkierter DNA in der Probe auf einen fünffachen Wert ergab keine Reduktion der Chromosomen-Markierung.

Die durch die Silberkörner angezeigte Hybridisierung ist demnach das Resultat unkontrollierter Wechselwirkungen und eindeutig als Artefakt zu charakterisieren.

Abbildung 4:

Polytäne Chromosomen aus einer X/Y-Speicheldrüse von D. hydei nach Behandlung mit RNase A und Denaturierung, hybridisiert mit $2x10^6$ dpm je Präparat radioaktiv markierter X/Y-DNA (spezifische Aktivität: $7.8x10^7$ dpm $^3H/\mu g$) unter Zugabe einer 2000fachen Menge an unmarkierter X/0-DNA in 2xSSC und 0.25% SDS bei 69°C für 40 Stunden. Die Expositionszeit betrug 92 Tage.
Lichtmikroskopische Aufnahme nach Giemsa-Färbung.

## 3. DNA/DNA- und DNA/RNA-Hybridmoleküle in Formamid-Lösungen

### 3.1. Überlegungen und Berechnungen

Die thermische Stabilität doppelsträngiger DNA nimmt linear mit steigender Formamid-Konzentration der Lösung ab (McConaughy et al., 1969; Casey und Davidson, 1977), die Reaktionen von DNA/RNA-Hybridmolekülen sind dagegen komplexer: in geringkonzentrierten Formamid-Lösungen sind die thermischen Stabilitäten relativ variabel, in Gegenwart von mehr als 50% Formamid nehmen sie nur noch wenig ab, sodaß hier die Differenz zu den Stabilitäten der DNA/DNA-Hybride maximal wird. Es gibt Temperaturbereiche mit einer optimalen DNA/RNA-Hybridbildung bei gleichzeitig vernachlässigbaren DNA/DNA-Reaktionen. Sie liegen nahe dem Wert der "strand separation temperature" ($T_{ss}$) für die DNA, die das irreversible Schmelzen der Hälfte aller doppelsträngigen DNA-Moleküle zur Folge hat (Casey und Davidson, 1977). $T_{ss}$ ist der Mittelpunkt einer Schmelzkurve von Nukleinsäuren, erstellt unter Anwendung von Hydroxyapatit oder Ribonuklease (Hamaguchi und Geiduschek, 1962). In wässrigen Lösungen liegt $T_{ss}$ etwa 7-10°C höher als der Mittelpunkt ($T_m$) eines durch Absorptionsmessung erstellten Schmelzprofils.

Die von Schildkraut und Lifson (1965) publizierte Gleichung stellt unter Ergänzung mit Daten von Thomas et al. (1976) die Temperatur mit einer maximalen Bildungsrate von DNA/RNA-Hybriden dar als Funktion von Salzgehalt und Formamid-Konzentration der Lösung und von der Basenzusammensetzung der Reaktionspartner:

$$T_{max} = 81.5 + 0.5(\%G+C) + 16.6 \log Na^+ - 0.6(\%\ \text{Formamid})$$

Die optimalen Bedingungen für eine DNA/RNA-Transkripthybridisierung lassen sich also unschwer errechnen. Drosophila

hydei DNA hat bei einer Dichte von 1.702 g/cm$^3$ (Hauptbande) in CsCl einen durchschnittlichen G+C-Gehalt von 41.8%, bestimmt nach Schildkraut et al. (1962). Für die Reaktionsbedingungen 3xSSC und 40% Formamid (Pukkila, 1975; Old et al., 1977) bzw. 4xSSC und 50% Formamid (Macgregor und Andrews, 1977; Morgan et al., 1980; Varley et al., 1980) resultiert:

$$T_{max} = 74.5°C \text{ bzw. } 70.6°C.$$

Tatsächlich wurden die Experimente jedoch bei 37-40°C durchgeführt. Unter den Voraussetzungen

$$T_{ss} = T_{max} \text{ und}$$
$$T_m = T_{ss} - (7\text{-}10)°C$$

und bei Bedingungen von 4xSSC und 50% Formamid

$$\text{mit } T_{max} = 70.6°C$$
$$\text{folgt } T_m = 61\text{-}64°C.$$

Die für DNA/RNA-Hybridisierungen bislang gewählten Temperaturen lagen also mehr als 30°C unter dem Reaktionsoptimum (= $T_{ss}$) und 21-27°C unterhalb des Schmelzpunktes der DNA!

Schon 1977 stellten Casey und Davidson fest: "In the absence of further information, $T_{1/2d}$-25 is commonly chosen as the optimal temperature for an RNA/DNA reaction." ($T_{1/2d}$ entspricht dem $T_m$-Wert einer optisch ermittelten Schmelzkurve von DNA.) Allerdings schränkten die Autoren die Allgemeingültigkeit ihrer Daten ein: "It is well known that data on relative thermal stabilities of homopolymer duplexes cannot be used for an accurate prediction of trends in the thermal stabilities of irregular natural polymers."

Anhand der von Schildkraut und Thomas et al. erstellten Gleichungen können angemessene Bedingungen angegeben werden. Thomas et al. wiesen auf die Formeln hin: "These equations have not been rigorously tested." Sie fanden jedoch anhand von Stabilitätsstudien an R-loop-Molekülen weitgehende Übereinstimmungen.

Basierend auf den von Schildkraut und Lifson (1965), von Thomas et al. (1976) und von Casey und Davidson (1977) pub-

lizierten Daten wurden optimale Bedingungen für DNA/RNA-Hybridisierungen an unserem System erarbeitet. Ein Formamid-Gehalt von mindestens 60% war in Hinblick auf die unterschiedlichen Stabilitäten der DNA/DNA- und DNA/RNA-Hybridmoleküle zu fordern, eine geringe Ionenkonzentration sollte die Schmelzpunkte niedrig halten und geeignete experimentelle Bedingungen liefern. Für eine Formamid-Lösung von 70% mit 1xSSC ergibt sich für einen G+C-Gehalt von 41.8% (Hauptbanden-DNA von D. hydei) nach der von Thomas et al. modifizierten Schildkraut-Formel die Reaktionstemperatur $T_{max}$ = 48.6°C.

Die Gültigkeit dieser Bedingungen wurde im Vergleich mit den bisher durchgeführten Prozeduren überprüft in Anwendung auf die vorliegende Problematik.

## 3.2. Schmelzanalyse von D. hydei DNA

Die thermische Stabilität von DNA wurde in Lösungen mit 4xSSC und 50% Formamid bzw. 1xSSC und 70% Formamid untersucht und die Korrelationen zwischen den Werten für $T_m$, $T_{ss}$ und $T_{max}$ hergestellt. Es wurde mitochondrielle DNA aus D. hydei (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Eckes) eingesetzt in der Absicht, eine Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen in Hinblick auf die Erfassung A+T-reicher Sequenzen vornehmen zu können. Das Mitochondrien-Genom hat ein Größe von 15.63 Kilobasen und enthält eine A+T-reiche Region von 1.7 Kilobasen mit weniger als 5% G+C (Eckes, 1981). Bei einer Dichte von 1.686 g/cm$^3$ in CsCl beträgt der duchschnittliche G+C-Gehalt 28.9%.

Abb. 5 zeigt die Schmelzprofile der DNA, aufgezeichnet durch Absorptionsmessung bei 280 nm (bei 254 nm ist die Absorption

Abbildung 5:

Thermische Denaturierung von mitochondrieller DNA aus D. hydei, gereinigt durch mehrere CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugationen und gelöst in 4xSSC und 50% Formamid bzw. 1xSSC und 70% Formamid bei 20°C. Die Schmelzanalyse erfolgte mit einer Heizrate von 1°C/min und Absorptionsmessung bei 280 nm in einem Gilford Spektralphotometer 250 mit Thermo Programmer 2527 und Recorder.

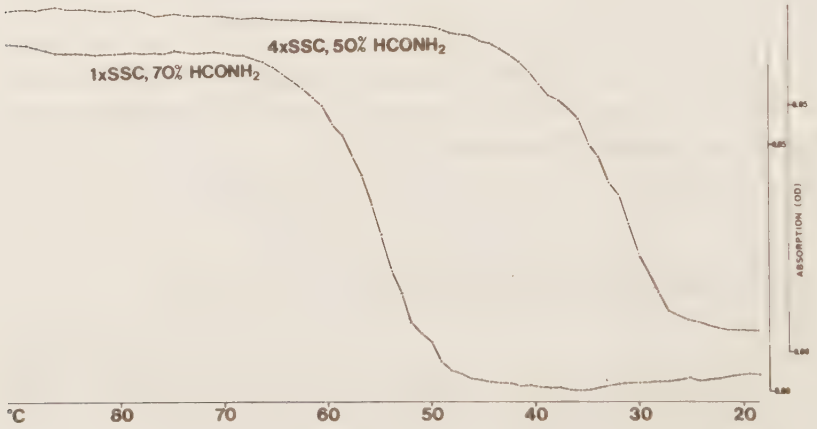



Tabelle 6:

Thermische Stabilitäten mitochondrieller DNA von D. hydei in Formamid-Lösungen .

| Formamid-Lösung | Schmelzbereich | $T_m$ ermittelt | $T_{ss}$ berechnet | $T_{max}$ berechnet |
|---|---|---|---|---|
| 50% in 4xSSC | 36-70°C | 55°C | 62-65°C | 64°C |
| 70% in 1xSSC | 22-50°C | 33°C | 40-43°C | 42°C |

des Formamid extrem hoch). Die Schmelzbereiche liegen bei 36-70°C in 4xSSC und 50% Formamid und bei 22-50°C in 1xSSC und 70% Formamid und lassen Schmelzpunkte ($T_m$) von etwa 53°C bzw. 34°C abschätzen. Nach der Definition

$$T_m = T_{ss} - (7\text{-}10)°C$$

ergeben sich Werte der "strand separation temperature" zu

$$T_{ss} = 62\text{-}65°C \text{ für 4xSSC, 50\% Formamid}$$

$$\text{bzw. } T_{ss} = 41\text{-}44°C \text{ für 1xSSC, 70\% Formamid.}$$

Die nach Schildkraut berechneten Werte für $T_{max}$ betragen 64°C bzw. 42°C. Die Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Sie bestätigen die Übereinstimmung der publizierten Daten und ihre Anwendbarkeit unter geeigneten Reaktionsbedingungen auf ein fremdes System.

## 3.3. Thermische Stabilität von DNA/RNA-Hybriden "in situ"

Die Untersuchung der thermischen Stabilitäten von DNA/RNA-Hybriden in Gegenwart von 70% Formamid und 1xSSC wurden an zytologischen Präparaten durchgeführt. Die Anwendbarkeit der berechneten Werte auf die Technik der "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung sollte auf diese Weise überprüft werden.

Bislang stehen ausschließlich Daten von Reaktionskinetiken zweier in Formamid-Lösung befindlicher Hybridisierungspartner zur Verfügung, die nicht nur eine Abhängigkeit von Konzentration, Größe und Komplexität der Sequenzen, von Ionenkonzentration, Temperatur und Zeit aufzeigen, sondern Abweichungen von kontrollierbaren Kinetiken zweiter Ordnung und Oberlagerungen von DNA/DNA- und DNA/RNA-Assoziierungen (Thomas et al., 1976; Casey und Davidson, 1977). Bei einer Hybridisierung "in situ" mit einem fixierten und einem frei beweglichen Hybridisierungspartner unter unbekannten Konzentrationen dieser Moleküle am Reaktionsort ist eine Analyse

der kinetischen Prozesse unmöglich; zudem sind die tatsächlichen Salzbedingungen im Präparat unkontrollierbar infolge der Anwesenheit von elektrische Ladungen tragenden Molekülen (Proteine, Lipide etc.).

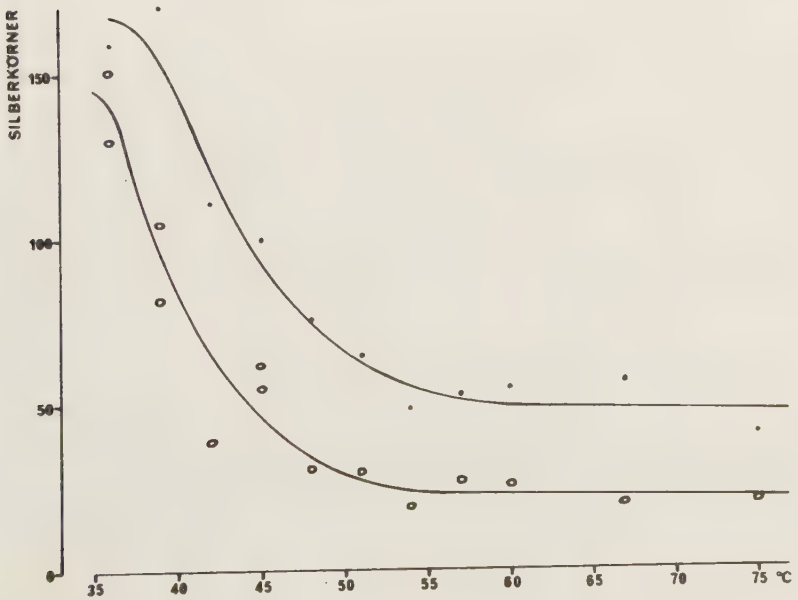
Um das Resultat eines "in situ"-DNA/RNA-Hybridisierungsexperimentes überprüfen und interpretieren zu können, ist die Verwendung einheitlicher und definierter DNA-Proben eine wesentliche Voraussetzung. D. hydei rDNA (kloniert in pBR 322), radioaktiv markiert mittels "Nicktranslation", und $^{3}$H-cDNA, hergestellt durch "reverse transcription" und sequenzhomolog zum 38S-rRNA-Precursormolekül von D. hydei, waren als Moleküle einheitlicher Sequenz und Komplexität geeignet. Die einsträngige cDNA ermöglichte eine spezifische DNA/RNA-Hybridisierung unter Ausschluß von DNA/DNA-Reaktionen.

Eine Analyse der thermischen Stabilitäten von rDNA/rRNA- bzw. cDNA/rRNA-Hybridmolekülen "in situ" erfolgte durch Schmelzung hybridisierter Sequenzen in Kernen primärer Spermatozyten von D. hydei. Die Hybridisierung wurde durchgeführt in 70% Formamid und 1xSSC bei 36°C. Nicht gebundene Moleküle wurden anschließend entfernt und die Hybride bei steigender Temperatur geschmolzen. Zur Bestimmung der relativen Mengen hybridisierter Sequenzen wurden in den Autoradiogrammen der Präparate die Silberkörner über den Spermatozytenkernen gezählt. Abb. 7 zeigt die graphische Darstellung der ermittelten Werte in Abhängigkeit von der Temperatur.

In einer "in situ" durchgeführten thermischen Denaturierung großer doppelsträngiger DNA/RNA- oder DNA/DNA-Moleküle ist ein teilweise geschmolzener (radioaktiv markierter!) DNA-Strang von einem vollständig gepaarten Molekül nicht zu unterscheiden, da gleiche Signalintensitäten - in Form von Silberkörnern im Autoradiogramm - entstehen. Um dies zu vermeiden und um nur tatsächlich doppelsträngige Sequenzen zu

Abbildung 7:

Schmelzprofil von DNA/rRNA-Hybriden in 1xSSC und 70% Formamid, erstellt "in situ" an Kernen primärer Spermatozyten von D. hydei. Die Spermatozytenkerne wurden hybridisiert mit $^{3}$H-rDNA (o) und $^{3}$H-38S-cDNA (.) in 1xSSC und 70% Formamid bei 36°C und anschließend in identischer Lösung bei in 3°C-Schritten steigender Temperatur inkubiert. Die Autoradiogramme wurden analysiert durch Auszählung der Silberkörner über je 20-30 Spermatozytenkernen pro Temperaturschritt anhand von lichtmikroskopischen Aufnahmen.



erfassen, wurden DNA-Proben einheitlicher Molekülgrößen von etwa 300 Nukleotiden (nach Behandlung mit Ultraschall) eingesetzt.

Bei der Interpretation der Schmelzprofile muß beachtet werden, daß sie nicht an nativen Molekülen, sondern an Hybriden erstellt wurden, deren Bildungstemperatur von 36°C in 1xSSC und 70% Formamid 12.6°C unter dem für eine maximale Reaktion berechneten Wert ($T_{max}$ = 48.6°C) lag, wodurch eine relativ hohe Rate an Basen-"mispairing" und folglich erniedrigte Schmelzpunkte verursacht wurden. Zudem erlaubte die Hybridisierungstemperatur von 36°C eine Reaktion der rDNA- und cDNA-Probe nicht nur mit rRNA, sondern auch mit rDNA-Sequenzen im Präparat. Da DNA/DNA-Hybride bei steigender Temperatur in Formamid-Lösung instabiler sind als DNA/RNA-Hybride, mag dies eine wesentliche Erklärung für die schon bei niedrigen Temperaturen erfolgte Denaturierung sein. Weiterhin konnten Wechselwirkungen hybridisierter rDNA mit Molekülen aus der Probe auftreten - ermöglicht durch einsträngige, mit rRNA nicht hybridisierende, nicht-codierende Bereiche (NTS, ITS) und durch Sequenzen des pBR 322 - , sodaß der Schmelzbereich stärker zu niedrigen Temperaturen hin verschoben wurde.

Aufgrund der Durchführung des Experimentes und der genannten Argumente erscheint es nicht sinnvoll, anhand dieser Schmelzprofile einen Schmelzpunkt oder eine optimale Hybridisierungstemperatur festzulegen. Ausschlaggebend ist, daß bei etwa 60°C sämtliche DNA/RNA-Hybride geschmolzen sind, die - unter Berücksichtigung von Molekülgröße, Basen-"mispairing" und DNA/DNA-Wechselwirkungen - bei mindestens 42°C nahezu vollständig hybridisiert vorlagen. Im Vergleich mit dem errechneten Wert $T_{max}$ = 48.6°C für eine optimale DNA/RNA-Hybridisierung scheint die Übertragung der Schildkraut-Formel und der Daten von Stabilitätsuntersuchungen an DNA/RNA-Hybriden in Formamid-Lösungen (Thomas et al., 1976; Casey und Davidson, 1977) gerechtfertigt und eine Anpassung

an dieses System möglich.

## 4. "In situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung unter stringenten Bedingungen

Nur der Einsatz stringenter Hybridisierungsbedingungen, die eine ausschließliche Bildung von DNA/RNA-Hybridmolekülen erlauben, kann bei Verwendung sehr heterogener und hochkonzentrierter DNA-Proben zu artefaktfreien Resultaten führen. Dem vorliegenden Problem - Versuch einer Identifizierung Y-spezifischer Transkripte - angepaßte Bedingungen konnten nur abgeschätzt und empirisch festgelegt werden, da weder Basenzusammensetzung oder -sequenz, noch die Größe und Komplexität der gesuchten RNA bekannt sind.

Eine Hybridisierungstemperatur von 46°C und eine Salzkonzentration von 1xSSC in 70% Formamid wurden als Bedingungen ermittelt, unter denen DNA/RNA-Hybridmoleküle noch stabil aber DNA/DNA Hybride ausgeschlossen sind. Die Spezifität dieser Hybridisierungsbedingungen wurde überprüft und nachgewiesen wie im folgenden dargestellt.

### 4.1. Hybridisierung unter Ausschluß von DNA/DNA-Wechselwirkungen

Die Stringenz der Bedingungen 1xSSC, 70% Formamid und 46°C für eine "in situ"-DNA/RNA-Hybridisierung konnte gezeigt werden an polytänen Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen von D. hydei, hybridisiert mit einer "Y-spezifischen" DNA-Probe (radioaktiv markierte X/Y-DNA mit einem 2000fachen Überschuß an unmarkierter X/O-DNA zwecks kompetitiver Unter-

Abbildung 8:

Polytäne Chromosomen einer X/Y-Speicheldrüse aus D. hydei nach Hybridisierung mit $3x10^6$ dpm pro Präparat radioaktiv markierter X/Y-DNA (spezifische Aktivität: $7.8x10^7$ dpm $^3H$ /µg) unter Zugabe eines 2000fachen Oberschusses an unmarkierter X/O-DNA in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 40 Stunden. Die Expositionszeit betrug 26 Wochen.
Lichtmikroskopische Aufnahme des Autoradiogramms nach Giemsa-Färbung.

drückung aller X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen). Weder über den Polytänchromosomen, noch über dem Y-Chromosom im Chromozentrum war eine Hybridisierung zu beobachten (Abb.8).

Somit war der vollständige Ausschluß von DNA/DNA-Reaktionen und also eine Voraussetzung für spezifische DNA/RNA-Hybridisierungen unter den gewählten Bedingungen gegeben.

## 4.2. Basenzusammensetzung und Stabilität der DNA/RNA-Hybride

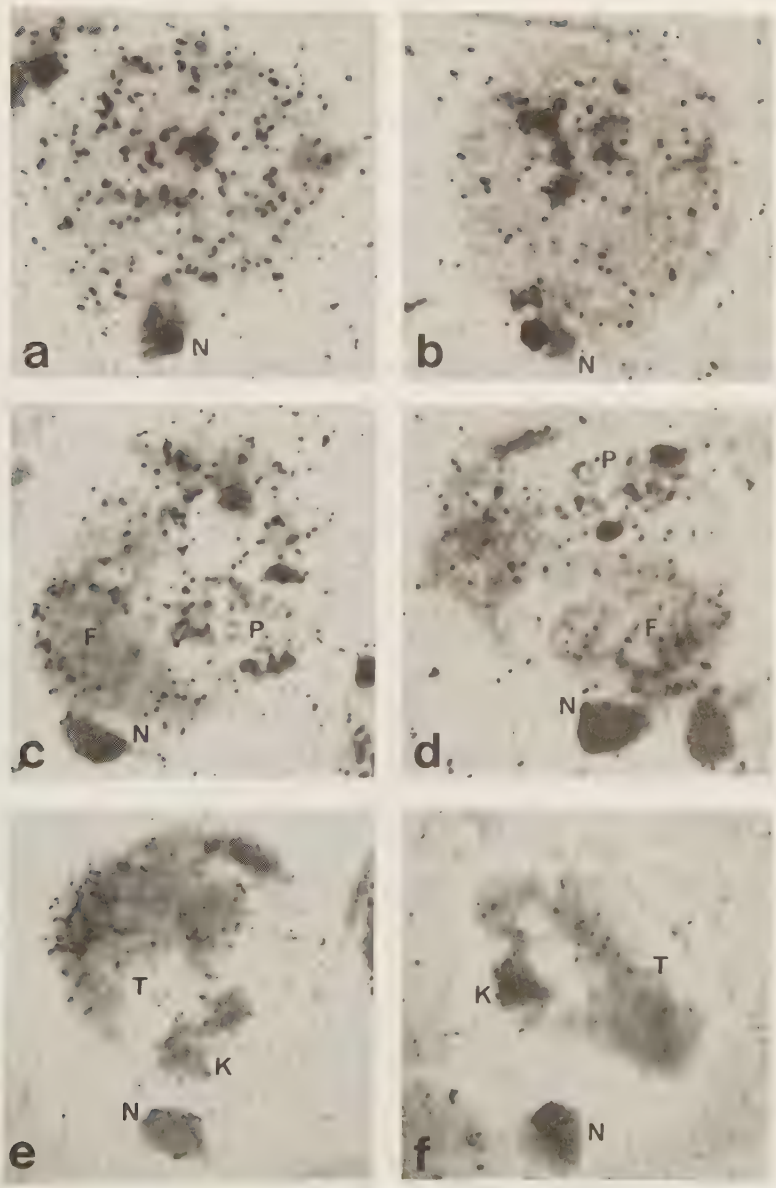
Die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen 1xSSC, 70% Formaldehyd und 46°C konnte möglicherweise zu einem Verlust bei der Erfassung A+T-reicher Sequenzen mit geringen Stabilitäten führen. Der Schmelzpunkt ($T_m$) der mitochondriellen DNA mit einem durchschnittlichen A+T-Gehalt von 71.1% lag unter diesen Bedingungen bei 33°C, der berechnete $T_{ss}$ entsprechend $T_{max}$ bei 40-43°C (Tab. 6). Diese Werte, ebenso wie das "in situ" hergestellte Schmelzprofil der DNA/RNA-Hybridmoleküle (Abb. 7), ließen diese Möglichkeit zu.

Um die Hybridisierungsrate von Sequenzen in Abhängigkeit von ihrer Basenzusammensetzung abschätzen und bei den durchgeführten Experimenten berücksichtigen zu können, wurde radioaktiv markierte Polydesoxythymidylsäure ($^3$H-poly(dT)) auf Kerne primärer Spermatozyten unter den Bedingungen 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C und in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C hybridisiert. Die unterschiedliche Menge hybridisierter Sequenzen stellte ein direktes Maß für die Stabilität der Hybride und für die Hybridisierungsrate dar. Das Medium 4xSSC, 50% Formamid schränkt bei 42°C Reaktionen mit (A)-reichen Sequenzen nicht ein.

Abb. 9 zeigt die resultierenden unterschiedlichen Hybridi-

Abbildung 9:

Kerne aus primären Spermatozyten verschiedener D. hydei Genotypen. a,b: X/O; c,d: X/A.$Y^{FP}$; e,f: X/$Y^{S.KT}$-A. Die Hybridisierungen wurden durchgeführt mit $3x10^5$ dpm pro Präparat $^3$H-poly(dT) (Spezifische Aktivität: 1 µCi/18.8 µg) in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C (a,c,e) bzw. 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C (b,d,f) für 40 Stunden. Die Expositionszeiten waren 9-14 Wochen.
Lichtmikroskopische Aufnahmen der Autoradiogramme nach Giemsa-Färbung. F: Fäden, K: Keulen, N: Nukleolus, P: Pseudonukleolus, T: Tubulibänder.


a
N
b
N
c
F
P
N
d
P
F
N
e
T
K
N
f
K
T
N

sierungsintensitäten mit Deutlichkeit. Die Markierung der unter den stringenten Bedingungen hybridisierten Kerne ist sehr viel geringer, doch quàlitativ nicht verschieden. X/O-Kerne weisen eine diffuse Verteilung von Silberkörnern auf (Abb. 9a, b) in Kernen vom $X/Y^{S.KT}$-A-Genotyp zeigen die "Tubulibänder" (Abb. 9e, f), im $X/A.Y^{FP}$-Genotyp die Matrix der "Fäden" Hybridisierung, der "Pseudonukleolus" ist unmarkiert (Abb. 9c, d).

Die Bedingungen 1xSSC, 70% Formamid und 46°C lassen eine Hybridisierung Reaktion A+T-reicher Sequenzen zu, haben aber eine starke Reduktion der Stabilitäten dieser Hybride zur Folge. Es ist anzunehmen, daß bei Einsatz natürlicher DNA-Sequenzen selbst mit unstatistischer Basenverteilung und hohem A+T-Anteil die Stabilitäten der Hybridmoleküle ausreichen, um ihre Erfassung zu erlauben.

## 4.3. Vergleich von Hybridisierungsbedingungen: Demonstration spezifischer und artefizieller Resultate

Ein Vergleich der Bedingungen für eine "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung nach Pukkila (1975) und den entwickelten stringenten Bedingungen (Schwochau und Herrnstadt, 1982) wurde durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter rDNA (kloniert in pBR 322) als DNA-Probe einheitlicher Sequenzen durchgeführt.

Besonders geeignete, da überschaubare und eindeutig interpretierbare Objekte stellen Präparationen von polytänen Chromosomen aus Speicheldrüsen von D. hydei Larven dar. Sie wurden mit der rDNA-Probe hybridisiert in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C und in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C. Einige Präparate wurden als Kontrollen vor der Hybridisierung mit Ribonuklease behandelt. Die Autoradiogramme

sind in Abb. 10 dargestellt.

Die Markierung des Nukleolus und des Zytoplasmas entspricht bei stringenten Bedingungen einer RNA-spezifischen Hybridisierung und der realen Verteilung von rRNA-Molekülen in der Zelle (Abb. 10a). Nach Behandlung mit Ribonuklease sind bis auf einen geringen Backgound keine Silberkörner zu sehen (Abb. 10b). Nach Hybridisierung in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C ist die Markierung über dem Nukleolus extrem hoch (Abb. 10c) durch intensive DNA/DNA-Wechselwirkungen der hybridisierten rDNA-Moleküle mit anderen aus der Probe und durch zusätzliche Hybridisierung von radioaktiver rDNA mit komplementären Sequenzen im Nukleolus-Organisator des Präparates. Die Bestätigung für diese Interpretation lieferte das Ribonuklease-behandelte Kontroll-Präparat (Abb. 10d): der Nukleolus ist intensiv markiert als Folge von DNA/DNA-Hybridisierungen. Das Zytoplasma ist frei von rRNA-Molekülen und erwartungsgemäß ohne Markierung.

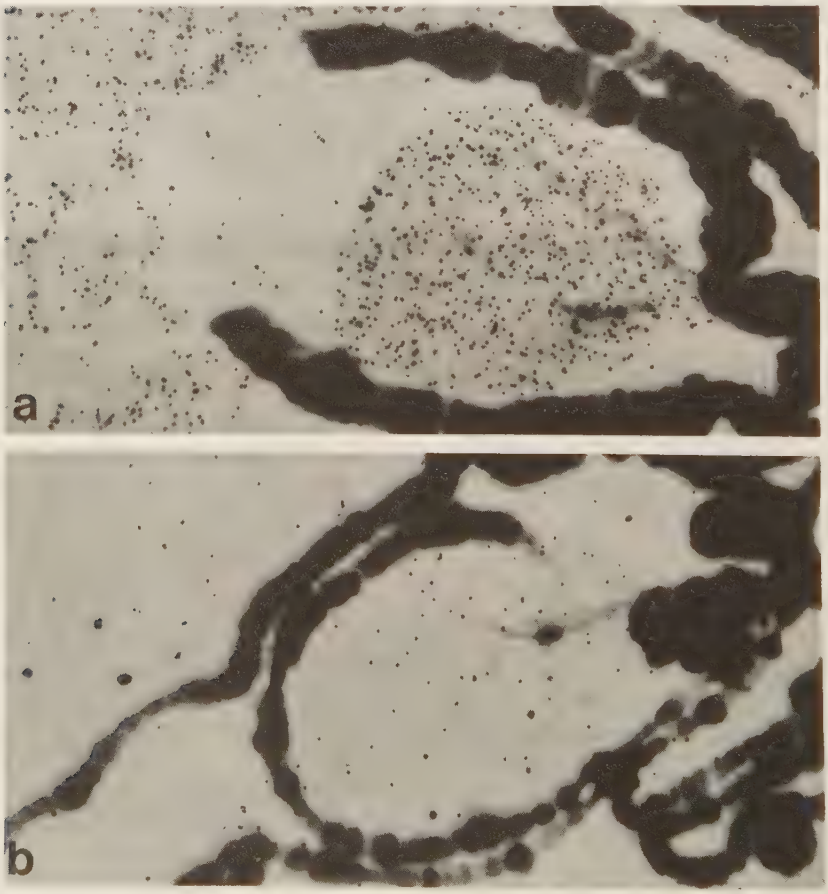
Dieses Experiment beweist, daß selbst bei gut kontrollierbaren Hybridisierungsansätzen mit wenig komplexen Proben stringente Bedingungen anzuwenden sind, wenn interpretierbare und artefaktfreie Ergebnisse erzielt werden sollen. Hybridisierungen unter den Bedingungen 70% Formamid und 1xSSC bei 46°C dagegen liefern artefaktfreie Resultate auf der Basis definierter Reaktionen von Sequenzen mit stastistischer Basenverteilung.

Eine gleiche radioaktiv markierte rDNA-Probe wurde unter identischen Bedingungen - 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C bzw. 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C - auf Präparate primärer Spermatozyten aus D. hydei hybridisiert. Das Resultat (Abb. 11) vermittelte einen Eindruck der Verteilung von rRNA-Molekülen in den Kernen dieser Zellen.

Die in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C hybridisierten Prä-

Abbildung 10:

Polytäne Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen von D. hydei X/Y-Männchen nach Hybridisierung mit $1x10^6$ dpm pro Präparat nicktranslierter rDNA (spezifische Aktivität: $4x10^7$ dpm $^3H$ /µg). Hybridisierungsbedingungen waren 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C (a,b) und 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C (c, d) für 40 Stunden. Kontrollpräparate wurden vor der Hybridisierung mit RNase A behandelt (b,d).
Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Autoradiographie und Giemsa-Färbung. Die Expositionszeiten betrugen 3 Tage. N: Nukleolus.



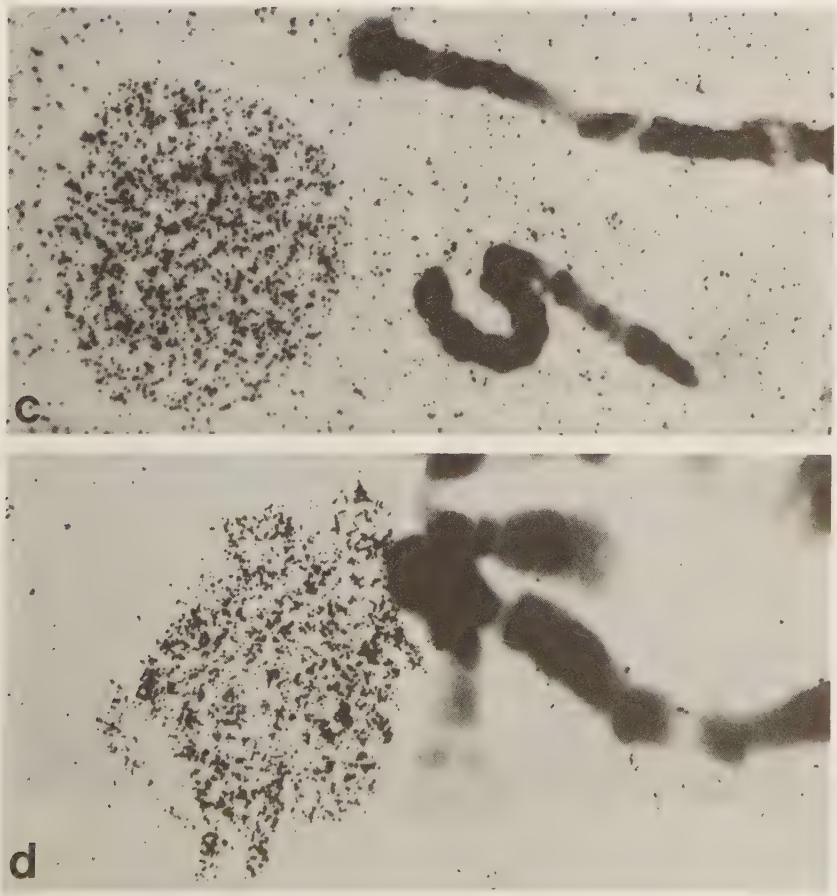
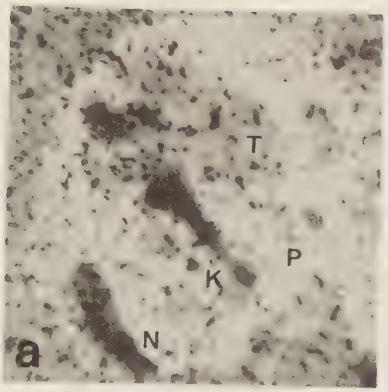
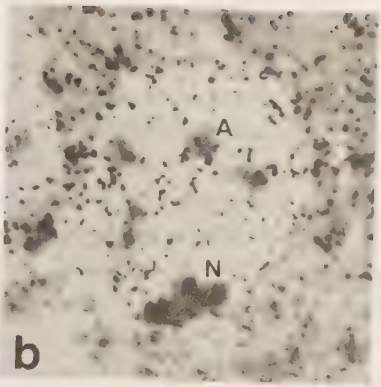
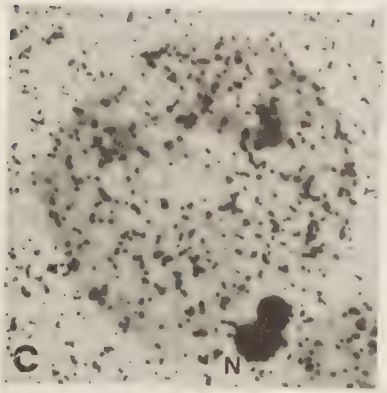

c
d

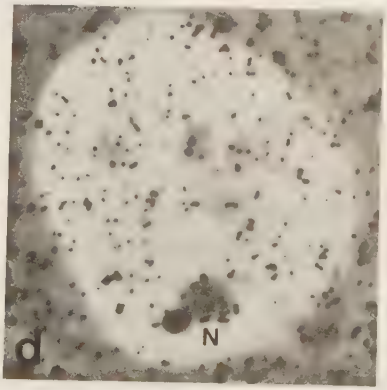
Abbildung 11:

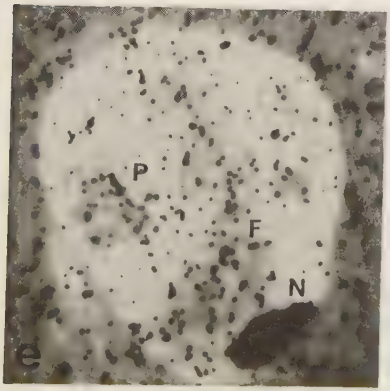
Kerne aus primären Spermatozyten verschiedener Genotypen von D. hydei. a: X/Y; b,c,d: X/O; e: X/A.$Y^{FP}$; f: X/$Y^{S.KT}$-A. Sie wurden hybridisiert mit $2x10^5$ dpm je Präparat radioaktiv markierter rDNA (spezifische Aktivität: $4x10^7$ dpm $^3H$ /µg) in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C (a,b,c,) bzw. 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C (d,e,f) für 40 Stunden. Die Expositionszeiten betrugen 8 Tage.
Lichtmikroskopische Aufnahmen der Autoradiogramme nach Giemsa-Färbung. A: Autosomen, F: Fäden, K: Keulen, N: Nukleolus, P: Pseudonukleolus, T: Tubulibänder.

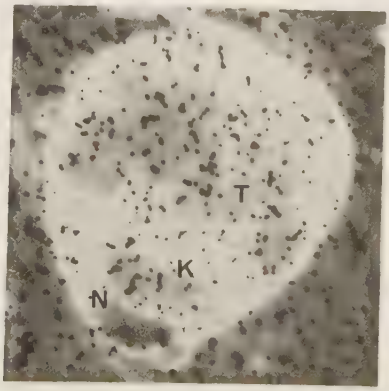

T
K
P
N
a


A
N
b


N
c


N
d


P
F
N
e


T
K
N

parate zeigen eine sehr starke Markierung aufgrund unspezifischer DNA/DNA-Reaktionen. Am Nukleolus fand eine intensive Hybridisierung statt (Abb. 11a, b, c), die jedoch bei Anwendung stringenter Bedingungen reduziert wurde (Abb. 11d, e, f) und also DNA/DNA-Hybridbildungen mit der rDNA des Nukleolus-Organisators als Ursache hatte. Die Konzentration von rRNA-Molekülen scheint im Nukleolus nicht höher zu sein als im restlichen Kernraum. Die tatsächliche rRNA-Verteilung in den Spermatozytenkernen in Abwesenheit unspezifischer Reaktionen zeigt eine Anreicherung über den Lampenbürstenschleifen (Abb. 11e, f) im Gegensatz zu einer diffusen Verteilung über X/O-Kernen (Abb. 11c, d). Der "Pseudonukleolus" ist kaum markiert (Abb. 11a, e), die Autosomen - gut sichtbar in jungen X/O-Kernen (Abb. 11b) - sind erwartungsgemäß frei von Silberkörnern.

## 5. "In situ"-Hybridisierungsexperimente: optimale Resultate und ihre Reproduktion

Die Wechselwirkungen zwischen den Reaktionspartnern in einem "in situ"-Hybridisierungsexperiment werden durch zahlreiche Parameter beeinflußt, die einer strengen Definiton bedürfen, um eindeutige und reproduzierbare Resulate zu erzielen.

### 5.1. Externe Aktefakte

Die Voraussetzung für durchführbare und vergleichbare Analysen in "in situ"-Hybridisierungen sind hervorragende Güte, d.h. extreme und gleichmäßige Quetschung der zytologischen Präparate, sodaß die Strukturen einen Zugang erlauben und eine eindeutige Zuordnung von Signalen gewährleistet ist.

Bei der Durchführung solch eines Experimentes sind Prozesse zu vermeiden, die zur Entstehung externer Artefakte - die von der eigentlichen Hybridisierungsreaktion, sei sie spezifisch oder nicht, unabhängig sind - führen können. Als Beispiele seien genannt: ungenügende Waschungen nach der Hybridisierung, große und ungleichmäßige Schichtdicke der Photoemulsion, teilweise reduzierte Silberbromid-Kristalle schon vor der Exposition und Beeinflussung der katalytischen Wirkung des Entwicklers durch Temperatur. Alle genannten Faktoren ergeben im Autoradiogramm unspezifische Signale und/oder einen erhöhten Background und erschweren eine korrekte Analyse enorm.

## 5.2. Reaktionspartner und Hybridisierungsbedingungen

In einem DNA/RNA-Hybridisierungsexperiment wird die Reaktion zwischen den Molekülen entscheidend beeinflußt durch die Wahl geeigneter Hybridisierungsbedingungen in Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung und -sequenz, der Molekülgröße und Komplexität der Sequenzen, ebenso durch die Konzentration der betreffenden Sequenzen im Präparat und in der zur Hybridisierung eingesetzten Probe.

Über die gesuchte Y-spezifische RNA lag keine Information vor, also konnten die Hybridisierungsbedingungen - berechnet, überprüft und diskutiert in den voranstehenden Kapiteln (III.3., 4.) - nur abgeschätzt werden.

Ebenso unbekannt war die Menge komplementärer DNA-Moleküle in der hergestellten "Y-spezifischen" DNA-Probe, zudem limitiert durch die erforderliche kompetitive Unterdrückung aller anderen - X-chromosomalen und autosomalen - Sequenzen mittels entsprechend großer DNA-Mengen. Der Einsatz von

$3x10^6$ dpm einer radioaktiv markierten X/Y-DNA mit einer spezifischen Radioaktivität von $3x10^7$ dpm $^3H/\mu g$, kompetiert mit einem 10000fachen Überschuß an unmarkierter X/O-DNA, bedeutete die Menge von 1 mg DNA, gelöst in einem Volumen von 30-50 µl zur Hybridisierung mit einem Präparat. Gleichzeitig jedoch standen in der gesamten DNA-Probe nur etwa 10 ng Y-chromosomale - d.h. nicht: "Y-spezifische"! - Moleküle zur Verfügung, von denen ein großer Anteil durch komplementäre X-chromosomale und autosomale Sequenzen auskompetiert wurde.

## 5.3. Effizienz der Hybridisierungsrate: mechanische und dynamische Probleme

Die Bildungsrate von Hybridmolekülen ist in großem Maß abhängig von der Konzentration der Hybridisierungspartner am Reaktionsort. Sie konnte entscheidend verbessert werden durch Erhöhung einerseits der Zugänglichkeit von Sequenzen im Präparat und andererseits der freien Beweglichkeit der Moleküle in der Probenlösung.

Die für die Hybridisierung eingesetzten "Y-spezifischen" DNA-Proben wiesen aufgrund der zum Kompetieren erforderlichen großen DNA-Mengen in kleinen Volumina hohe Viskositäten auf. Die Chance der relativ wenigen "Y-spezifischen" Moleküle, durch Diffusion an den Reaktionsort zu gelangen, war weitgehend eingeschränkt. Durch Reduktion der Molekülläng en auf etwa 300 Nukleotide mittels Behandlung mit Ultraschall wurde ihre Diffusionsrate erhöht und zudem die Viskosität der DNA-Lösung geringer.

Ein Problem stellt bei "in situ"-Hybridisierungen die weiträumige Verteilung der flüssigen Phase zwischen Deckglas und Präparat dar. Die Moleküle haben in der Flüssigkeit über weite Strecken zu diffundieren, um in die Nähe des Präpara-

tes und der fixierten Sequenzen zu gelangen. Folgende Anordnung schaffte kürzest-mögliche Diffusionswege: der Aufenthaltsraum der Probenlösung wurde auf ein 1 mm hohes, zylindrisches Volumen von 30-40 µl mit der Grundfläche des Präparates (Durchmesser: 6-7 mm) festgelegt.

Nukleinsäuresequenzen des zytologischen Präparates können im Hybridisierungsexperiment nur erfaßt werden, wenn ihre Basen frei zugänglich zur Verfügung stehen. Die Matrix von Lampenbürstenschleifen besteht aus akkumulierten Ribonukleoprotein-Partikeln, die mehr oder weniger kompakt organisiert sind und die Zugänglichkeit der RNA-Sequenzen verhindern. Um das Proteinmaterial weitgehend zu entfernen, wurden die Präparate vor der Hybridisierung mit Proteinase behandelt. Es wurden Bedingungen für ein maximales Ausmaß der Protein-Hydrolyse bei gleichzeitiger Erhaltung und Identifizierbarkeit der charakteristischen Schleifenstrukturen ermittelt.

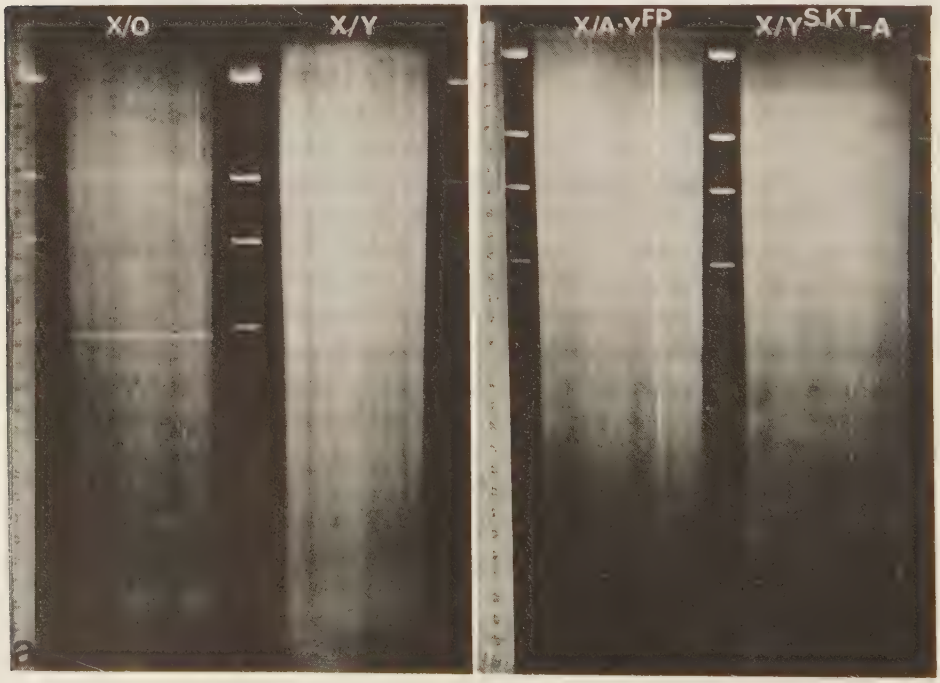
## 6. Standardmethoden für Filterhybridisierungen und ihre Kontrolle

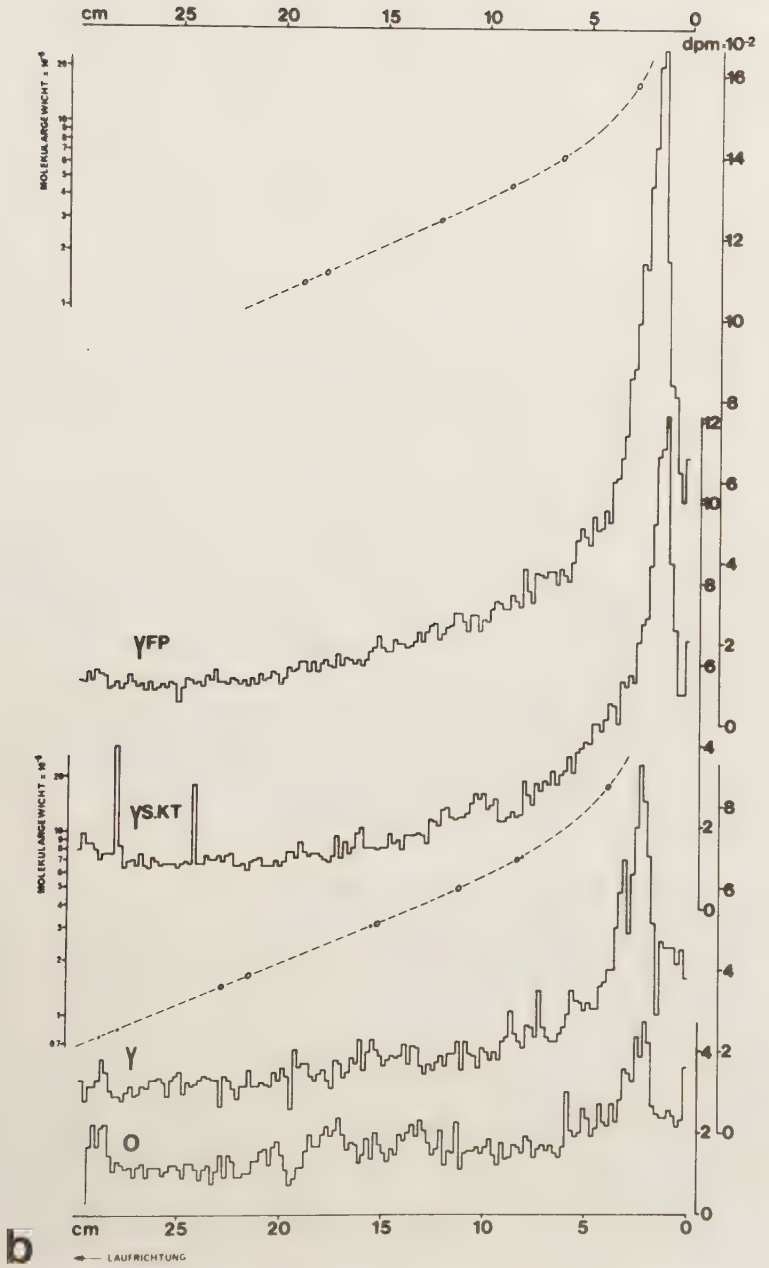
### 6.1. Hybridisierungsbedingungen und unkontrollierbare Reaktionen

Der Versuch einer Identifizierung Y-spezifischer DNA-Moleküle wurde anhand von Restriktionsmustern der DNA verschiedener D. hydei Genotypen vorgenommen. Männchen der Konstitution $X/A.Y^{FP}$ und $X/Y^{S.KT}$-A mit zwei komplementären Fragmenten des Y-Chromsoms sollten eine Lokalisation der Sequenzen im Vergleich mit einem X/Y-Genotyp vornehmen lassen. DNA aus X/O-Tieren wurde im gleichen Experiment als Kontrolle eingesetzt.

Abbildung 12:

Hochmolekulare DNA aus Fliegen der Genotypen X/O, X/Y, X/X/A.$Y^{FP}$ und X/$Y^{S.KT}$-A wurde mit Eco RI behandelt und elektrophoretisch in horizontalen Agarose-Flachgelen (0.8%) aufgetrennt (a: Ethidiumbromid-Färbung). Die Restriktionsfragmente wurden auf Nitrocellulose-Filter transferiert und hybridisiert mit $3x10^7$ dpm einer Y-spezifischen DNA-Probe (radioaktive X/Y-DNA der spezifischen Aktvität $3.5x10^7$ dpm $^3H$/µg mit einem 6500fachen Überschuß an unmarkierter X/X-DNA) in 2xSSC und 0.25% SDS bei 68°C für 45 Stunden. Die Hybridisierungsmuster auf den Filtern (b) wurden ermittelt durch Bestimmung der Radioaktivität von 2 mm breiten Streifen. Als Molekulargewichtsstandards dienten HindIII-Restriktionsfragmente von Lambda-DNA (o) mit 15.6, 6.4, 4.4, 2.9, 1.5 und $1.3 \times 10^6$ Dalton. Das größte Molekül ist ein Assoziat aus dem ersten und vierten Fragment mit $18.5 \times 10^6$ Dalton. Einige Banden stellen Restriktionsfragmente (.) mitochondrieller DNA dar (Eckes, 1981).




cm
25
20
15
10
5
0
dpm·10⁻²
MOLEKULARGEWICHT x M⁻¹
γFP
γS.KT
γ
O
cm
25
20
15
10
5
0
LAUFRICHTUNG

b

Entscheidend war die Verwendung von DNA mit Molekulargewichten größer als $10^8$ Dalton, wie sie durch die von Schwochau (1979) beschriebene Prozedur erhalten wurde. Hochmolekulare Hauptbanden-DNA der verschiedenen Genotypen wurde mit dem Restriktionsenzym Eco RI inkubiert und die entstandenen Spaltprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Ethidiumbromid-Färbung (Abb. 12a) läßt etwa 30 Banden erkennen, die sowohl Restriktionsfragmente der mitochonriellen DNA - sie bandiert in CsCl-Grandienten neben der Hauptbande und wurde zum Teil mitextrahiert - und der rDNA-Einheiten darstellen als auch die Abschnitte jener repetitiven DNA-Sequenzen, die Eco RI-Schnittstellen besitzen und identische Bruchstücke liefern. Dem Y-Chromosom lassen sich durch Vergleich der Genotypen keine Banden zuordnen.

Die DNA-Moleküle wurden auf Nitrocellulose-Filter transferiert und mit radioaktiv markierter X/Y-DNA in Gegenwart einer 6500fachen Menge an unmarkierter X/X-DNA hybridisiert unter Standard-Bedingungen (2xSSC, 0.25% SDS bei 68°C). Es war zu erwarten, daß ausschließlich Y-spezifische Sequenzen ein radioaktives Signal ergeben. Die Radioaktivitätsverteilungen, dargestellt in Abb. 12b, sind sehr heterogen, wobei hauptsächliche Hybridisierungen mit DNA-Sequenzen im hochmolekularen Bereich zu finden waren, die also für Eco RI keine oder nur sehr wenige Schnittstellen besaßen.

Unter Berücksichtigung des "Kontrollfilters" erschienen jedoch weiterführende Analysen dieses Experimentes nicht gerechtfertigt: DNA-Moleküle aus X/O-Männchen zeigten eine scheinbare Hybridisierung Y-spezifischer Sequenzen. Das vorliegende Resultat ist eindeutig artefiziell als Folge unkontrollierter Reaktionen, die in "in situ"-Hybridisierungsexperimenten verdeutlicht werden konnten (III.2.2.). DNA/DNA-Wechselwirkungen zwischen hybridisierten Molekülen und weiteren komplementären Sequenzen aus der Probe führten zu unspezifischen radioaktiven Signalen, die über die tatsächliche Herkunft der Moleküle keine Aussage erlaubten.

Vergleichbare Effekte ergaben unauswertbare Resultate in DNA/RNA-Filterhybridisierungsexperimenten, durchgeführt zur Identifizierung Y-spezifischer Transkripte. RNA aus Hodenanlagen von D. hydei Larven (3. Entwicklungsstadium) wurde elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt (Abb. 13a) und nach der Standardmethode von Alwine et al. (1977) auf aktives DBM-Papier transferiert.

Zur Hybridisierung wurde eine identische "Y-spezifische" DNA-Probe eingesetzt. Parallel war eine Abschätzung der Menge Y-spezifischer Transkripte im Verhältnis zur Gesamt-RNA beachsichtigt durch Verwendung von radioaktiv markierter X/Y-DNA ohne kompetitive Unterdrückung X-chromosomaler und autosomaler Sequenzen. Die Hybridisierung wurde nach Vorschrift durchgeführt in 5xSSC und 50% Formamid bei 42°C. Die Radioaktivität auf den Filtern nach Hybridisierung (Abb. 13b) entsprach im wesentlichen der relativen Mengenverteilung der RNA und stellte zudem eine vielfache Menge der gebundenen radioaktiv markierten DNA dar, die nach theoretischen Oberlegungen hätte spezifisch hybridisieren können.

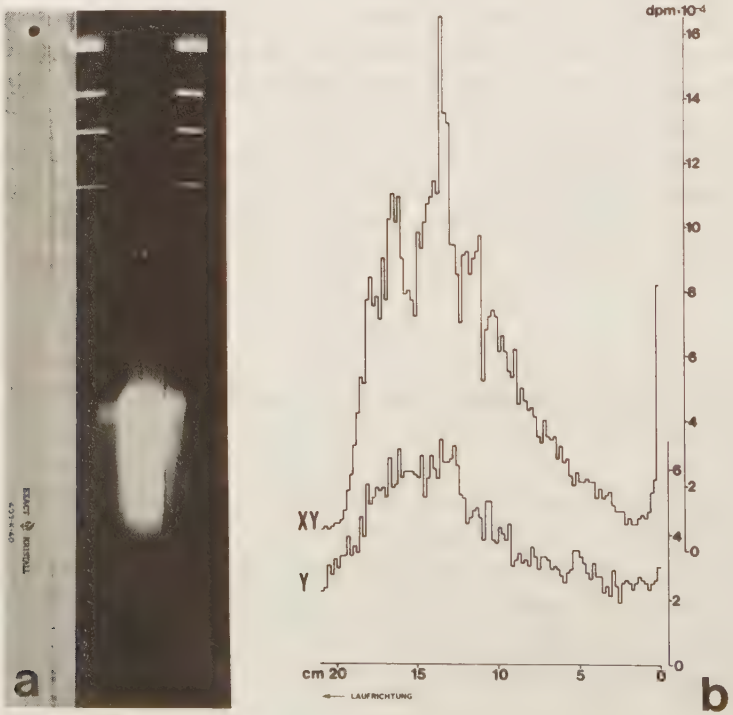
In beiden Experimenten waren eine Erhöhung des Überschusses an unmarkierter DNA in der Probe und eine Beschallung und Vorhybridisierung der DNA-Lösung ohne Einfluß auf die Resultate.

## 6.2. DNA-Absorption durch deaktiviertes DBM-Papier

In Filterhybridisierungsexperimenten unter der Verwendung von DBM-Papier war generell eine sehr hohe Radioaktivitätsmenge als Untergrund festzustellen. Beispielsweise zeigten die Filter, dargestellt in Abb. 13b, eine Backgound-"Hybridisierung" von etwa 25000 dpm pro 2x60 mm-Streifen an Positionen, wo im Ethidiumbromid-gefärbten Gel keine RNA sicht-

Abbildung 13:

RNA aus 2000 Hodenanlagen von D. hydei X/A.$Y^{FP}$-Larven wurde durch CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt, in einem horizontalen Agarose-Flachgel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt (a: Ethidiumbromid-Färbung) und auf DBM-Papier transferiert. Die Hybridisierung erfolgte in 5xSSC und 50% Formamid bei 42°C für 40 Stunden mit $1x10^8$ dpm radioaktiv markierter X/Y-DNA (spezifische Aktivität: $4x10^7$ dpm $^3H/\mu g$) unter Zugabe eines 2000fachen Überschusses an unmarkierter E.coli-DNA bzw. DNA aus D. hydei X/X-Weibchen. Die Hybridisierungsmuster auf den Filtern (b) wurden ermittelt durch Bestimmung der Radioaktivitätsmenge an jeweils 2 mm breiten Streifen. Molekulargewichtsstandards waren HindIII-Restriktionsfragmente von Lambda-DNA (15.6, 6.4, 4.4, 2.9, 1.5, 1.3 und ein Assoziat von 18.5 Kilodalton).



bar war. Bei Einsatz der DNA-Proben mit je $1x10^8$ dpm und 5 mg DNA ließ sich eine adsorbierte DNA Menge von mehr als 10 $\mu g/cm^2$ Filterfläche errechnen. Selbst bei der Anwendung stringenter Hybridisierungsbedingungen - 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C - , die Reaktionen adsorbierter Moleküle mit weiteren Sequenzen der Probe ausschließen, und nach gründlicher Deaktivierung des Papiers durch mehrmaligen Wechsel der Lösung (1xSSC, 70% Formamid, 0.25% SDS, 0.02%-0.04% (wt /vol) je Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und Rinderserumalbumin, 2% Glycin) und zusätzlicher Vorhybridisierung mit unmarkierter DNA wurden von der anschließend zugegebenen radioaktiven Probe durchschnittlich 800 $dpm/cm^2$ Filter unspezifisch gebunden (Abb. 14).

Unter diesen Umständen erschien eine Identifizierung geringer RNA-Mengen auf dem Filter unmöglich, sie würden durch den Untergrund vollständig überdeckt. Außerdem ist DBM-Papier für sehr genaue Analysen kaum geeignet, da die chemischen Verbindungen des Papiers instabil sind, die Bindungskapazität somit oft ungleichmäßig ist und die Reproduktion exakter Resultate erschwert.

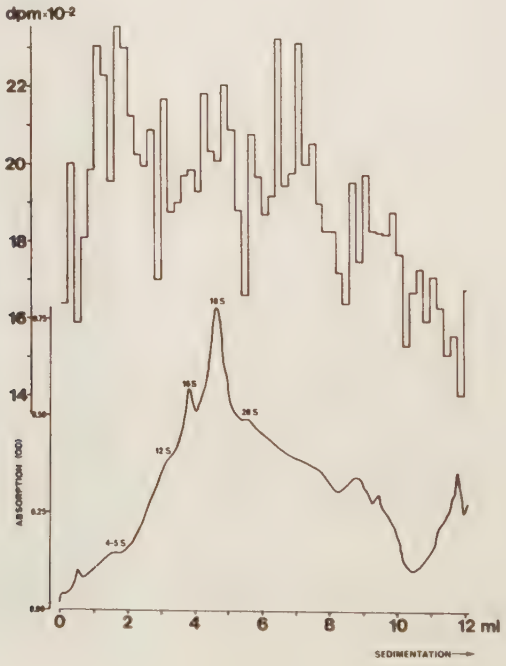
## 7. Technik zur Fixierung von RNA an Nitrocellulose-Filtern

Nitrocellulose-Filter schienen für Feinanalysen von RNA wesentlich besser geeignet als das üblicherweise eingesetzte DBM-Papier: die chemische Struktur des Nitrocellulose-Papiers ist homogen und eine unspezifische Adsorption von Nukleinsäuren nach der "Deaktivierung" minimal. In Anlehnung an Schwinghamer und Shepherd (1980) und Thomas (1980) wurde eine Technik erarbeitet zur Fixierung von RNA an Nitrocellulose-Filtern.

Die Moleküle wurden in 50% Formamid bei 65°C denaturiert und

Abbildung 14:

Poly(A)-haltige RNA aus 5000 Hodenanlagen von D. hydei X/A.$Y^{FP}$-Larven, isoliert mittels poly(U)-Sepharose und aufgetrennt durch Zonenzentrifugation in einem linearen Zucker-Dichtegradienten (5-60% Saccharose in "Nexmed"). Die Zentrifugationsbedingungen waren 40000 rpm bei 1°C für 13 Stunden im SW40Ti-Rotor. Der Gradient wurde optisch bei 254 nm vermessen und die RNA einzelner Fraktionen von je 0.2 ml wurde an DBM-Papier fixiert. 60 deaktivierte Rundfilter wurden "vorhybridisiert" in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 4 Stunden mit 3 mg Human Placenta DNA und anschließend für 22 Stunden in gleicher Lösung unter Zugabe von $2x10^7$ dpm radioaktiv markierter DNA aus D. hydei X/Y-Männchen mit einer 3000fachen Menge an unmarkierter Weibchen-DNA (X/X) inkubiert. Die Radioaktivitätsmenge auf jedem Filter wurde bestimmt. Die Untergrund-Radioaktivität liegt bei 1600 dpm pro 2 $cm^2$ und Filter.



stabilisiert in Anwesenheit von Formaldehyd, der mit Aminogruppen der organischen Basen zur Bildung von Schiff'schen Basen reagierte und die Rückfaltung der RNA-Moleküle zu Sekundärstrukturen verhindern sollte. Nach elektrophoretischer Trennung in Formaldehyd-enthaltenden Agarosegelen erfolgte der Transfer auf Nitrocellulose-Papier in 20xSSC nach der Methode von Southern (1975). Durch anschließendes Erhitzen der Filter sollten die Bindungen mit dem Formaldehyd gelöst werden und die organischen Basen für eine Hybridisierung zur Verfügung stehen. Von einer Waschung der Filter direkt nach dem Transfer wurde in den Rezepturen abgeraten, um einen RNA-Verlust zu vermeiden. Die mit 20xSSC behandelten Filter waren nach dem Erhitzen brüchig und kaum zu verarbeiten.

Die Prozeduren, exakt durchgeführt nach den zitierten Vorschriften, ergaben die Adsorption von durchschnittlich 52% einer RNA-Fraktion von Molekulargewichten zwischen 0.5 und $1.4 \times 10^6$ Dalton bzw. etwa 16% bei Molekulargewichten von $2.7\text{-}4.0 \times 10^4$ Dalton. Irreversibel fixiert waren jedoch nur 36% bzw. 4% der Moleküle, die nach Durchführung einer Hybridisierungsexperimentes auf dem Filter zurückblieben.

Die Bindungseffizienz wurde überprüft in Abhängigkeit von verschiedenen Kriterien wie Salzkonzentration, Anwesenheit von Formaldehyd, Temperatur und Ausmaß der Denaturierung eingesetzter RNA-Moleküle. Es wurden Bedingungen festgelegt, die einen nahezu 100%igen Transfer von RNA-Molekülen (größer als $0.5 \times 10^6$ Dalton) auf Nitrocellulose-Filter und ihre irreversible Fixierung zu 55-65% bewirkten. Kleine Sequenzen bis $4 \times 10^4$ Dalton wurden zu maximal 22% irreversibel gebunden. Ausschlaggebend für die irreversible Fixierung der RNA-Moleküle zu einem hohen Prozentsatz war die Gegenwart von Magnesium-Ionen (ermittelt nach pers. Mitteilung von Prof. Schwochau) und Formaldehyd, Salzbedingungen von 6xSSC waren ausreichend und erlaubten im Anschluß eine gute Handhabung der Filter.

Eine Bindung von RNA aus einer Lösung direkt an Nitrocellulose-Filter wurde mit gleicher Effizienz erzielt. Um eine Zerstörung der Nitrocellulose-Struktur zu verhindern, war die Formamid-Konzentration der Lösung nach Denaturierung der RNA (in 50% Formamid mit 6% Formaldehyd bei 65°C für 15 min) auf weniger als 15% zu reduzieren und Formamid-Rückstände auf den Filtern vor ihrem Erhitzen restlos zu entfernen. Die dazu notwendige Waschung der Filter in Anwesenheit von 6xSSC, 10 mM $MgCl_2$ und 6% Formaldehyd hatte keine Ablösung von RNA-Molekülen zur Folge.

# IV. RESULTATE VON HYBRIDISIERUNGEN UNTER STRINGENTEN BEDINGUNGEN: IDENTIFIZIERUNG Y-SPEZIFISCHER NUKLEOTIDSEQUENZEN

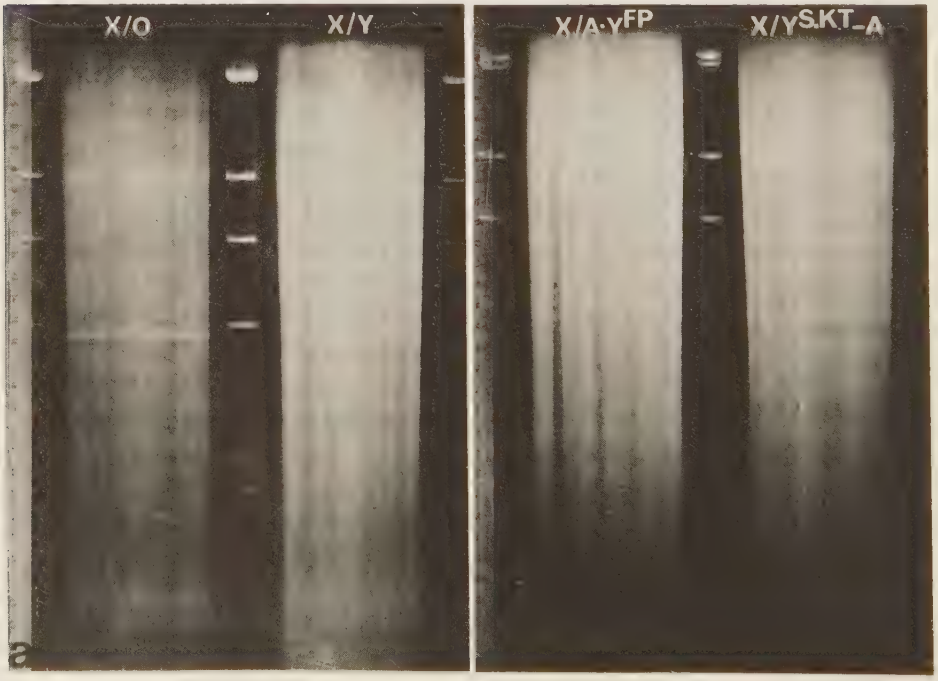
## 8. Y-spezifische DNA und ihre genetische Aktivität in der meiotischen Prophase

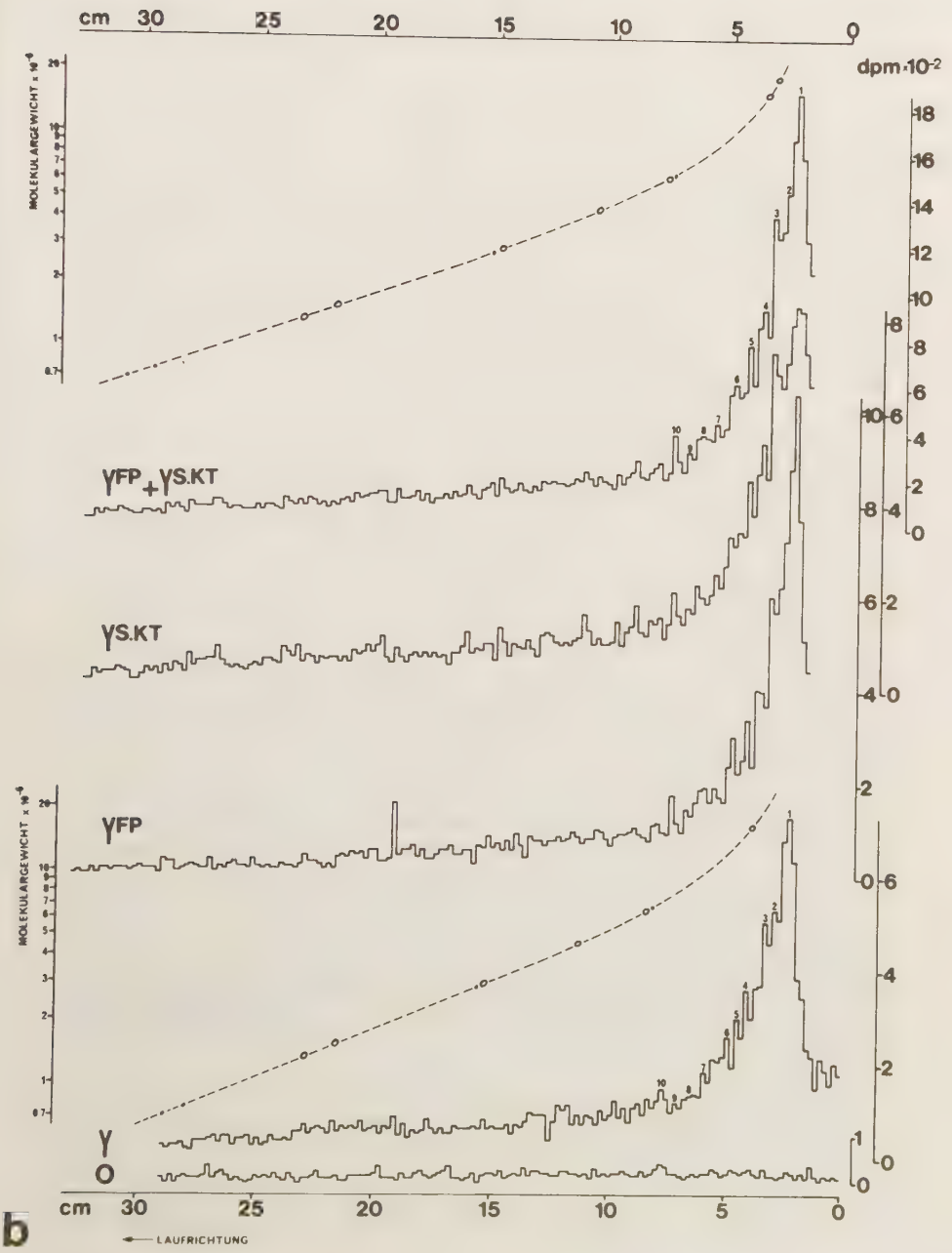
Eine Charakterisierung Y-spezifischer und in der männlichen Keimbahn genetisch aktiver DNA-Sequenzen mittels eines Filterhybridisierungsexperimentes war möglich durch den Einsatz einer entsprechenden RNA-Probe. In Hodenanlagen von D. hydei X/Y/Y-Larven (3. Entwicklungsstadium) des Stammes Nr. 703/33 transkribierte RNA wurde in Organkultur radioaktiv markiert und zur Hybridisierung versetzt mit einem großen Überschuß an unmarkierter Gesamt-RNA aus D. hydei X/O-Fliegenmännchen. Infolge der kompetitiven Unterdrückung durch die unmarkierten Transkripte X-chromosomaler und autosomaler Herkunft sollten ausschließlich Sequenzen spezifisch für das Y-Chromosom identifiziert werden.

Hochmolekulare DNA der D. hydei Genotypen X/Y, X/$Y^{S.KT}$-A, X/A.$Y^{FP}$ und X/O (als Kontrolle), isoliert nach der Methode von Schwochau (1979) mit Molekulargewichten von größer als $10^8$ Dalton, wurde mit dem Restriktionsenzym Eco RI gespalten. Die Restriktionsfragmente wurden elektrophoretisch in Agarosegelen aufgetrennt (Abb. 15a), auf Nitrocellulose-Filter transferiert und hybridisiert mit der "Y-spezifischen" RNA-Probe. Anhand der resultierenden Radioaktivitätsverteilungen (Abb. 15b) konnten eine Vielzahl von Restriktionsfragmenten mit komplementären Y-spezifischen Sequenzen bezeichnet werden, wobei die Hauptmenge der hybridisierenden DNA im hochmolekularen Bereich zu finden war. Da der Kontrollfilter mit fixierter X/O-DNA keine Radioaktivität aufwies, schien die kompetitive Unterdrückung aller nicht Y-spezifischen

Abbildung 15:

Darstellung Y-chromosomaler DNA, codierend für Y-spezifische Transkripte in primären Spermatozyten von D. hydei. Eco RI-Restriktionsfragmente von DNA aus X/O-, X/Y-, X/A.$Y^{FP}$- und $X/Y^{S.KT}$-A-Genotypen wurden in horizontalen Agarose-Flachgelen (0.8%) elektrophoretisch aufgetrennt (a: Ethidiumbromid-Färbung), auf Nitrocellulose-Filter transferiert und hybridisiert mit einer radioaktiv markierten RNA aus 2000 Hodenanlagen von X/Y/Y-Larven unter Zugabe von unmarkierter RNA aus 8g X/O-Fliegen. Die Hybridisierungsbedingungen waren 2xSSC, 0.25% SDS bei 65°C für 40 Stunden. Das Hybridisierungsmuster (b) wurde ermittelt durch Bestimmung der Radioaktivität von 2mm breiten Streifen. Als Längenstandards dienten HindIII-Restriktionsfragmente von Lambda-DNA (o) mit Molekulargewichten von 15.6, 6.4, 4.4, 2.9, 1.5, 1.3 und einem Assoziat von 18.5 x $10^6$ Dalton und Eco RI-Restriktionsfragmente mitochondrieller DNA (.) (Eckes, 1981).




cm 30 25 20 15 10 5 0
dpm·10⁻²
MOLEKULARGEWICHT x 10⁻³
γFP + γS.KT
γS.KT
γFP
γ
O
cm 30 25 20 15 10 5 0
LAUFRICHTUNG

b

Sequenzen vollständig zu sein, sodaß die Resultate der Hybridisierung als spezifisch angesehen werden können.

Die beiden Y-chromosomalen Fragmente der Genotypen X/A.$Y^{FP}$ und X/$Y^{S.KT}$-A sind, bedingt durch die Herstellung (Hess, 1971), komplementär und ergänzen sich zu einem vollständigen Y-Chromosom. Die für die DNA dieser beiden Genotypen erhaltenen Hybridisierungsmuster wurden summiert und verglichen mit der Verteilung der Y-spezifischen Sequenzen von X/Y-DNA: auf der Basis vorhandener Übereinstimmung wesentlicher Hybridisierungs-Signale kann die Reproduzierbarkeit der Resultate als gesichert gelten.

Eine Zuordnung der Y-spezifischen, hybridisierenden Sequenzen zu jeweils einem der zwei Fragmente ($Y^{FP}$ und $Y^{S.KT}$) ist anhand dieses Experimentes nicht möglich, da etliche Parameter - Eco RI-Schnittstellen, entstehende Fragmentgrößen, ihre Anzahl und ihr Anteil an Y-spezifischen Sequenzbereichen usw. - eine Zufälligkeit der entstehenden Resulate bewirken können. Unterschiede zwischen den Genotypen sind möglicherweise innerhalb der hochmolekularen Sequenzen zu finden, hier jedoch aufgrund der eingesetzten Techniken nicht erkennbar.

Die dargestellten Hybridisierungsmuster beweisen die Existenz von DNA-Sequenzen, die spezifisch für das Y-Chromosom sind und in der meiotischen Prophase männlicher Keimzellen transkribiert werden. Aufgrund der großen Anzahl der identifizierten Sequenzen war jedoch eine gezielte Isolierung von Molekülen nicht möglich, und eine umfassende Analyse - da nur mit immensem Aufwand durchführbar - erschien als nicht sinnvoll.

## 9. Y-spezifische DNA in "in situ"-Hybridisierungen an Mitose-Chromosomen

Die "Y-Spezifität" der wie beschrieben hergestellten DNA-Proben wurde bestätigt durch ein "in situ"-Hybridisierungsexperiment an mitotischen Metaphase-Chromosomen. Durch Verwendung des D. hydei Genotyps $Y^{S.KT}$-X/A.$Y^{FP}$ (Männchen des Stammes KOM 290/2) konnte zwischen den beiden Y-chromosomalen Fragmenten unterschieden werden (Abb. 16a).

DNA-Proben, bestehend aus radioaktiv markierter X/Y-DNA und jeweils einer 2000fachen Menge unmarkierter X/0- bzw. X/-A.$Y^{FP}$- bzw. X/$Y^{S.KT}$-A-DNA, wiesen entsprechend "Y-spezifische", "$Y^{S.KT}$-spezifische" und "$Y^{FP}$-spezifische" Eigenschaften auf, sodaß die Hybridisierung eine Markierung beider Y-Chromosom-Teile, nur des $Y^{S.KT}$- oder des $Y^{FP}$- Fragmentes ergab (Abb. 16c, d, b). X-Chromosom und Autosomen waren in jedem Fall unmarkiert und schienen also durch die überschüssige unmarkierte DNA auskompetiert zu sein.

Aufgrund der kinetischen Verhältnisse ist hier die Erfassung vorwiegend repetitiver Sequenzen anzunehmen, die - wenn auch nicht Y-fragmentspezifisch - zumindest mit sehr unterschiedlichen Häufigkeiten auf dem Y-Chromosom verteilt sind.

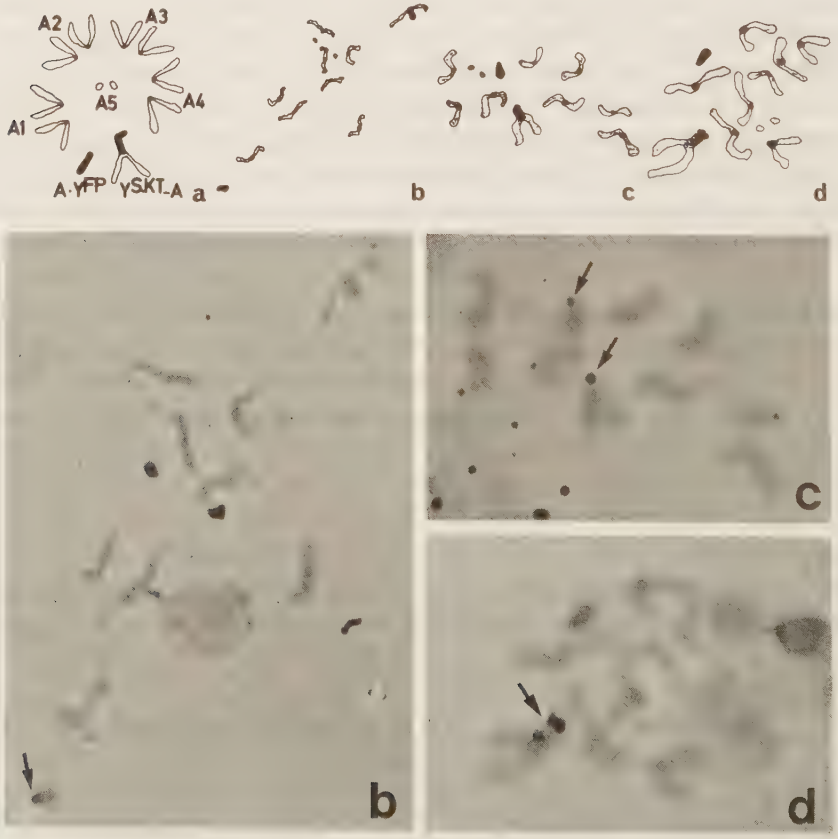
## 10. "In situ"-Hybridisierung an Transkripte Y-chromosomaler Lampenbürstenschleifen

### 10.1. Identifizierung und Lokalisation Y-spezifischer RNA

Die Lampenbürstenschleifen des Y-Chromosoms, sichtbar in der

Abbildung 16:

Präparationen von Mitose-Chromosomen des D. hydei Genotyps $Y^{S.KT}$-X/A.$Y^{FP}$ (a: schematische Darstellung), behandelt mit RNase A und NaOH und hybridisiert mit $2x10^6$ dpm pro Präparat radioaktiv markierter X/Y-DNA (spezifische Aktivität: $7.8x10^7$ dpm $^3H/\mu g$) unter Zugabe eines jeweils 2000fachen Überschusses an unmarkierter DNA aus X/O- (c), X/A.$Y^{FP}$- (d) bzw. X/$Y^{S.KT}$-A- (b) Männchen. Hybridisierungsbedingungen waren 2xSSC und 69°C für 40 Stunden.
Phasenkontrast-Aufnahmen der Autoradiogramme nach 92 Tagen Exposition und Färbung mit Karminessigsäure.



meiotischen Prophase männlicher Keimzellen, wurden auf ihren Gehalt an Y-spezifischen Transkripten untersucht. In einem "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierungsexperiment wurde eine radioaktive "Y-spezifische" DNA-Probe - hergestellt wie beschrieben - hybridisiert mit Präparationen von Kernen primärer Spermatozyten aus Hoden von D. hydei Männchen. Die Hybridisierungsbedingungen von 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C erlaubten ausschließlich spezifische Reaktionen von DNA- mit RNA-Molekülen.

Die Autoradiogramme, dargestellt in Abb. 17, lassen unterschiedlich intensive, schleifenspezifische Markierungen erkennen, welche die Existenz von Y-spezifischen Transkripten aufzeigen. Die signifikanteste Hybridisierung erfolgte am "Pseudonukleolus" (Abb. 17e), selten sind über den "Fäden" Silberkörner zu finden (Abb. 17e, Pfeil). Die "Tubulibänder" sind deutlich markiert (Abb. 17f, h), über den "Keulen" treten meist wenige Silberkörner auf, in einigen Fällen sind sie jedoch vermehrt (Abb 17g). Eine oft zu beobachtende punktförmige Markierung in der Nähe des Nukleolus (Abb. 17g, h, Pfeil) könnte über den "Schlingen" liegen, die in fixierten und gefärbten Präparaten nicht sichtbar werden. Der Nukleolus ist in allen Fällen unmarkiert, ebenso die Autosomen, die in jungen Kernen gut zu sehen sind (Abb. 17c, d).

## 10.2. Kontrollexperimente

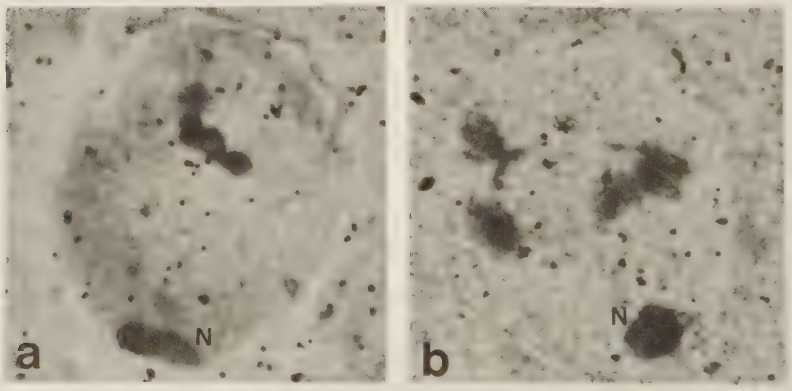
Die Spezifität der Hybridisierungsreaktionen für DNA/RNA-Hybride und für Y-spezifische Sequenzen wurde anhand entsprechender Kontrollexperimente nachgewiesen.

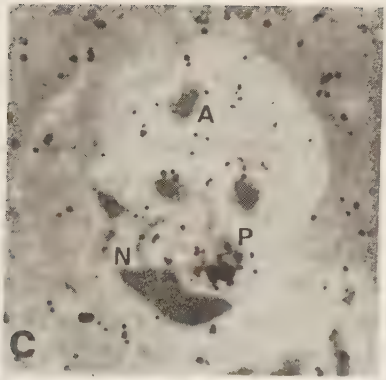
An Präparaten von X/Y-Spermatozytenkernen, die vor der Hybridisierung mit Ribonuklease behandelt wurden, ist keine Hybridisierung festzustellen (Abb. 17b).

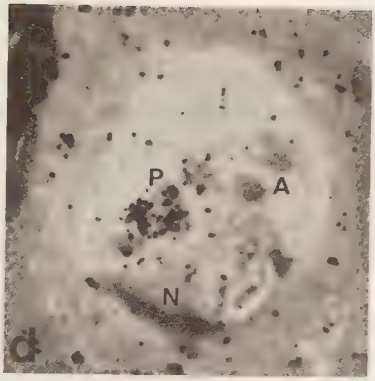
Abbildung 17:

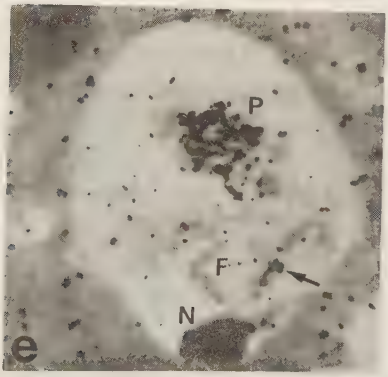
Kerne primärer Spermatozyten von D. hydei mit den genetischen Konstitutionen X/O (a), X/Y (b), X/A.$Y^{FP}$ (c,d,e) und X/$Y^{S.KT}$-A (f,g,h) nach Hybridisierung mit je Präparat $2x10^6$ dpm radioaktiv markierter X/Y-DNA (spezifische Aktivität: $2.4x10^7$ dpm $^3H/\mu g$) unter Zugabe eines 3500fachen Überschusses an unmarkierter X/X-DNA in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 40 Stunden. Das Präparat X/Y (b) wurde vor der Hybridisierung mit RNase A behandelt.

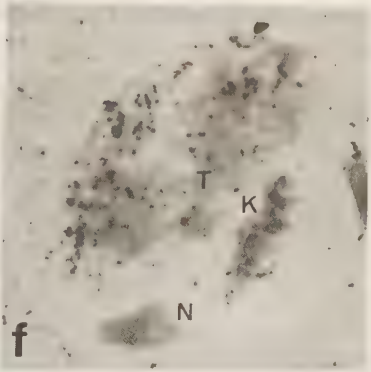
Lichtmikroskopische Aufnahmen der Autoradiogramme nach 25 Tagen Exposition und Giemsa-Färbung. A: Autosomen, F: Fäden, K: Keulen, N: Nukleolus, S: Schlingen, T: Tubulibänder.

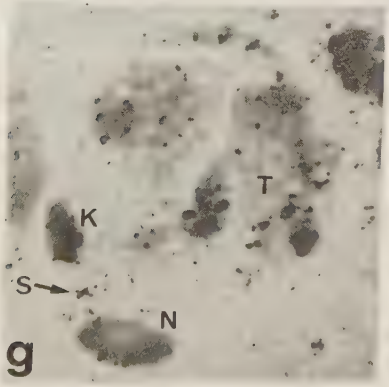


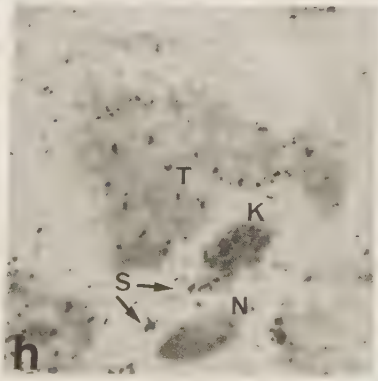

A
N
P
c


P
A
N
d


P
F
N
e


T
K
N
f


T
K
S
N
g


T
K
S
N
h

Spermatozytenkerne aus X/O-Tieren zeigen nach Hybridisierung unter identischen Bedingungen mit einer "Y-spezifischen" DNA-Probe keine Markierung (Abb. 17a). Die kompetitive Unterdrückung aller X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen ist somit für die gewählten experimentellen Bedingungen nachgewiesen.

Die Hybridisierung am "Pseudonukleolus" wurde quantifiziert in einem unter identischen Bedingungen durchgeführten Experiment nach Zugabe eines 2000fachen bzw. 10000fachen Überschusses an unmarkierter X/X-DNA. Die vergleichende Analyse erfolgte durch Zählung von Silberkörnern in den Autoradiogrammen. Sie ergab nach Auswertung von je 20 Spermatozytenkernen und unter Berücksichtigung des Backgrounds in den Präparaten Werte von 212 bzw. 215 Körnern über den "Pseudonukleoli". Da somit keine Reduktion der hybridisierenden Sequenzen zu beobachten war, kann die Y-Spezifität der Resultate dieser Hybridisierungsexperimente als gesichert angesehen werden.

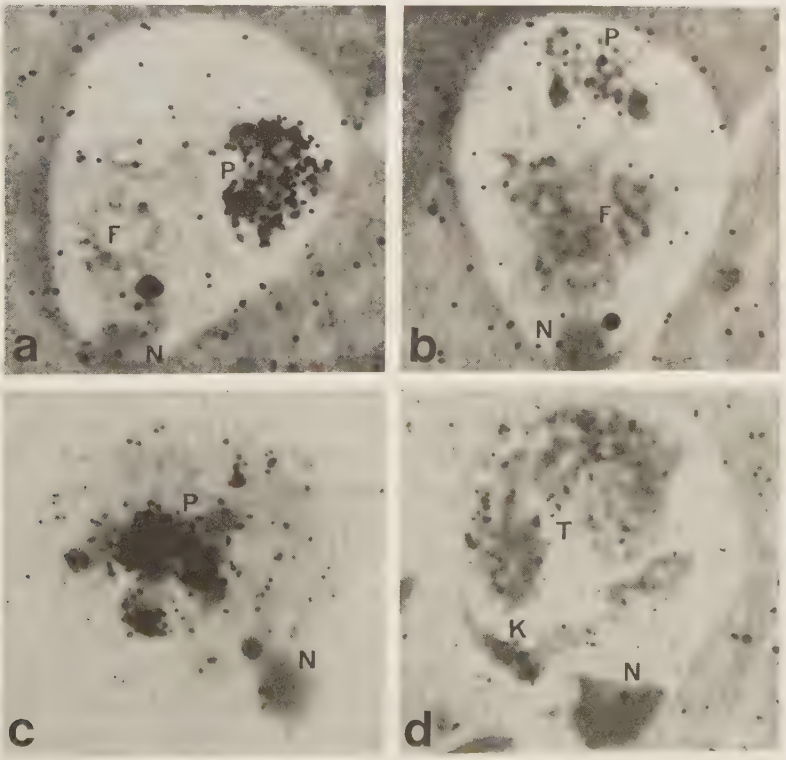
## 10.3. Schleifenspezifität der Transkripte

Die Zuordnung der an den Schleifen identifizierten Y-spezifischen Transkripte zu codierenden DNA-Sequenzen des Y-Chromosoms war durch Hybridisierungen in Anwesenheit von kompetierender DNA eines der Y-chromosomalen Fragmente ($Y^{FP}$ und $Y^{S.KT}$) möglich.

Unter Zugabe eines 2000fachen Überschusses an unmarkierter DNA aus $X/A.Y^{FP}$-Männchen wurde eine radioaktiv markierte X/Y-DNA - die gleiche wie bisher verwendet - hybridisiert auf Spermatozytenkerne des Genotyps $X/A.Y^{FP}$ unter identischen Bedingungen. Das Resultat dieser Hybridisierung ist in Abb. 18b dargestellt: der "Pseudonukleolus" ist vollstän-

Abbildung 18:

Kerne primärer Spermatozyten der D. hydei Genotypen X/A.$Y^{FP}$ (a,b,c) und X/$Y^{S.KT}$-A (d) nach Hybridisierung in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 40 Stunden. Folgende DNA-Proben wurden eingesetzt: pro Präparat 2-3x$10^6$ dpm radioaktiv markierte X/Y-DNA (spezifische Aktivitäten: 7.8x$10^7$ (a,b,c,) bzw. 2.4x$10^7$ (d) dpm $^3$H/µg) mit einem 2000fachen Überschuß an unmarkierter DNA der Genotypen X/X (a), X/A.$Y^{FP}$ (b,d) und X/$Y^{S.KT}$-A (c). Die Expositionszeiten betrugen 25 Tage (d), 43 Tage (a,b) bzw. 74 Tage (c).
Lichtmikroskopische Aufnahmen der Autoradiogramme nach Giemsa-Färbung. F: Fäden, K: Keulen, P: Pseudonukleolus, T: Tubulibänder.



dig unmarkiert; es sind nur wenige Silberkörner zu sehen, die der Menge des Backgrounds in allen Präparaten entsprechen. Im Vergleich zeigt Abb. 18a einen X/A.$Y^{FP}$-Spermatozytenkern, der nach Hybridisierung unter exakt identischen Bedingungen mit einer "Y-spezifischen" DNA-Probe (radioaktive X/Y-DNA auskompetiert mit X/X-DNA) am "Pseudonukleolus" intensiv markiert ist.

In Spermatozytenkernen des Genotyps X/$Y^{S.KT}$-A, hybridisiert mit der "$Y^{S.KT}$-spezifischen" DNA-Probe (kompetiert mit X/A.$Y^{FP}$-DNA), sind die "Tubulibänder" und die "Keulen" markiert (Abb. 18d).

In einem anderen Experiment unter Einsatz einer "$Y^{FP}$-spezifischen" DNA-Probe (radioaktiv markierte X/Y-DNA mit einem 2000fachen Überschuß an unmarkierter X/$Y^{S.KT}$-A-DNA), durchgeführt unter identischen Hybridisierungsbedingungen, ist der "Pseudonukleolus" in X/A.$Y^{FP}$-Spermatozytenkernen von Silberkörnern bedeckt (Abb. 18c), in X/$Y^{S.KT}$-A-Spermatozytenkernen ist keine Hybridisierung zu beobachten.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß - insbesondere die prominente Markierung des "Pseudonukleolus" betreffend - den zu beobachtenden Hybridisierungen keine unspezifischen Reaktionen (etwa mit Proteinen) zugrunde liegen. Nicht-kompetierte radioaktive Y-chromosomale DNA-Moleküle ohne Sequenzhomologien zu beispielsweise den Transkripten am "Pseudonukleolus" führten zu keinem Signal. Die Resultate beweisen die Spezifität der Transkripte an den Lampenbürstenschleifen für den jeweiligen Abschnitt des Y-Chromosoms.

## 11. Akkumulation Y-spezifischer RNA an den Lampenbürstenschleifen

Hinsichtlich der Hybridisierung am "Pseudonukleolus" läßt sich in Abhängigkeit vom Wachstum der Spermatozyten eine Akkumulation von Y-spezifischen RNA-Sequenzen beobachten (Abb. 17c-e, 19).

In sehr jungen Kernen ist nahe dem Nukleolus ein kleiner Bereich markiert (Abb. 17c, 19a), der bei sich ausfaltender Schleife dem entstehenden "Pseudonukleolus" entspricht. Mit zunehmendem Wachstum der Kerne wird die Markierung intensiver und entfernt sich vom Nukleolus (Abb. 17d, 19a). Im ausgereiften Kern bei voll ausgebildeter Schleifenstruktur und endgültiger Größe des "Pseudonukleolus" ist die Intensität der Hybridisierung maximal (Abb. 17e, 19b).

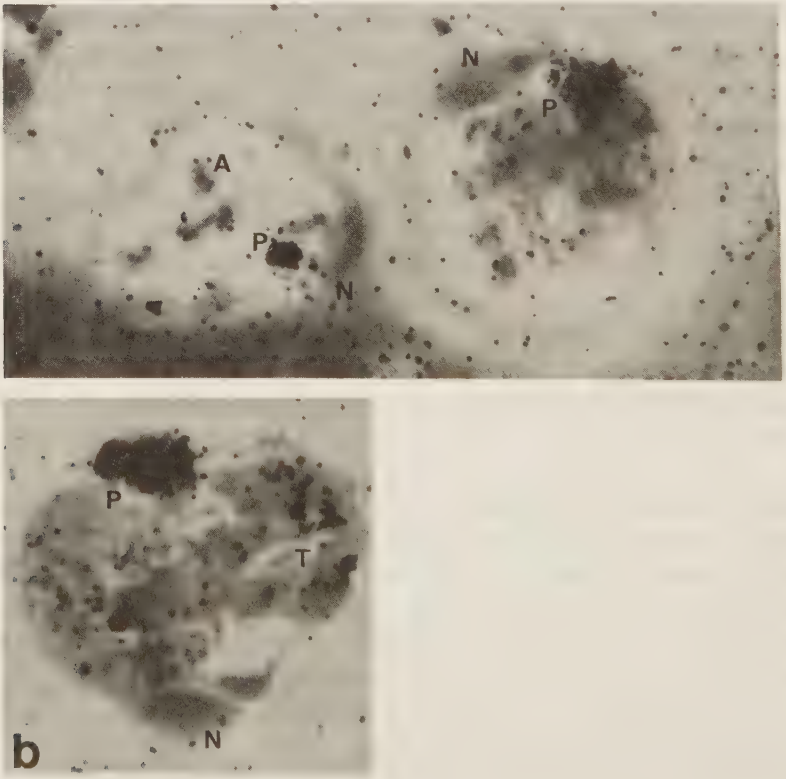
Anhand dieser Beobachtungen könnte man eine Transkription der RNA vom Nukleolus in Richtung auf den Pseudonukleolus postulieren und die dortige Akkumulation der Moleküle.

## 12. RNA-Synthese und -Speicherung in Spermatozytenkernen

Eine DNA/RNA-Transkripthybridisierung unter Einsatz radioaktiv markierter X/Y-DNA sollte die Verteilung der Gesamt-RNA in den Kernen primärer Spermatozyten aufzeigen. Erwartungsgemäß sind nach der Hybridisierung - exakt durchgeführt wie in den vorhergehenden Experimenten - intensive Signale über den Kernen aller untersuchten Genotypen (X/O, X/A.$Y^{FP}$, X/$Y^{S.KT}$-A und X/Y) zu beobachten (Abb. 20), wobei jedoch qualitative Unterschiede in Abhängigkeit von der Ausbildung Y-chromsomaler Lampenbürstenschleifen auffallen.

Abbildung 19:

Kerne unterschiedlicher Entwicklungsstadien aus primären X/Y-Spermatozyten von D. hydei innerhalb eines Hoden-Quetschpräparates. Die Hybridisierung erfolgte mit $3x10^6$ dpm pro Präparat radioaktiv markierter X/Y-DNA (spezifische Aktivität: $7.8x10^7$ dpm $^3H/\mu g$) unter Zugabe eines 2000fachen Überschusses an unmarkierter X/O-DNA in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 40 Stunden.
Lichtmikroskopische Aufnahmen der Autoradiogramme nach 74 Tagen Exposition und Giemsa-Färbung. A: Autosomen, N: Nukleolus, P: Pseudonukleolus, T: Tubulibänder.



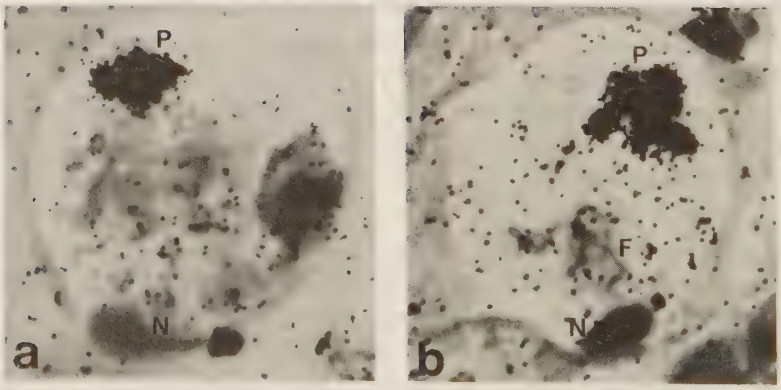
In Kernen des X/A.$Y^{FP}$-Genotyps ist der "Pseudonukleolus" sehr stark markiert (Abb. 20b), der Vergleich mit einer Hybridisierung ausschließlich Y-spezifischer Sequenzen (Abb. 18a) unter exakt identischen Bedingungen zeigt die Vervielfachung des Signals. In X/$Y^{S.KT}$-A-Kernen treten im Kernraum, anscheinend zufällig verteilt und keiner Struktur zuzuordnen, mehrere Anhäufungen von Silberkörnern auf (Abb. 20f, g, h), ebenso in X/O-Kernen (Abb. 20 e). In X/Y-Kernen dagegen, bei Anwesenheit aller Schleifenstrukturen, ist ausschließlich der "Pseudonukleolus" intensiv markiert (Abb. 20a). Im Laufe der Spermatozytenentwicklung ist die Anreicherung hybridisierender RNA-Sequenzen am "Pseudonukleolus" zu beobachten (Abb. 20b, c, d).

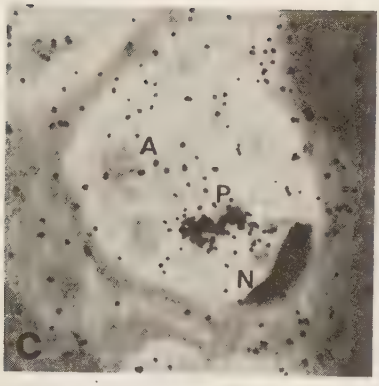
Der Nukleolus ist in allen Kernen nur wenig markiert als Folge einer Hybridisierung mit rRNA. Über den Autosomen junger Kerne (Abb. 20c) ist nach kurzer Expositionszeit keine Hybridisierung zu beobachten, da die lokale Konzentration von Transkripten dort zu gering, ihre Komplexität zu groß ist etc. und einzelne RNA-Moleküle nicht erfaßt werden konnten. Nach längerer Expositionszeit wurden auch Sequenzen sichtbar, die beispielsweise über den "Tubulibändern", den "Keulen" (Abb. 20h) und diffus im Kernraum verteilt und weniger stark lokal konzentriert sind. Moleküle, wie sie beispielsweise als (A)-reiche Sequenzen in der "Fäden"-Matrix identifiziert wurden (Abb. 9c, d), sind aufgrund ihrer eventuell geringen Menge und/oder hohen Komplexität und der hier gezwungenermaßen relativ kurz gewählten Expositionszeiten nicht erfaßbar.

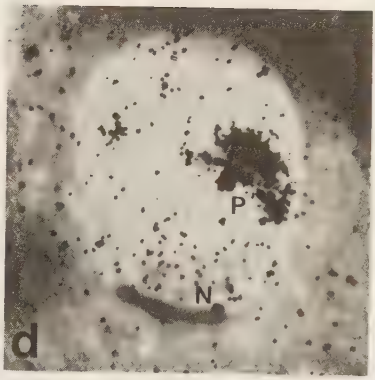
In allen Quetschpräparaten von Hodenteilen, die auch frühe postmeiotische Zellstadien enthielten, konnten über den Zysten je ein bis zwei Silberkorn-Anhäufungen beobachtet werden, die jedoch aufgrund der Prozedur der Präparate-Herstellung keiner bestimmten Struktur zuzuordnen waren.

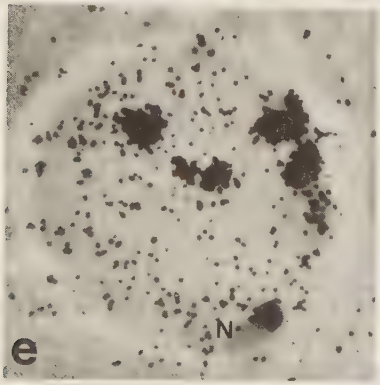
Abbildung 20:

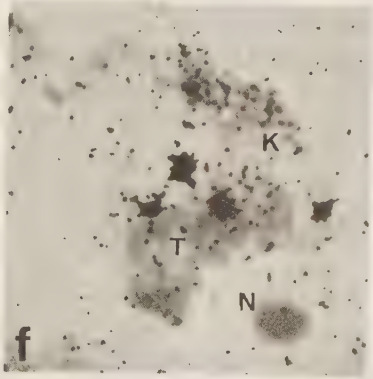
Kerne primärer Spermatozyten von D. hydei Genotypen X/Y (a), X/A.$Y^{FP}$ (b,c,d), X/0 (e) und X/$Y^{S.KT}$-A (f,g,h) nach Hybridisierung mit je Präparat $2x10^6$ dpm radioaktiv markierter DNA aus X/Y-Männchen (spezifische Aktivität: $7.8x10^7$ dpm $^3H/\mu g$) in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 40 Stunden.
Lichtmikroskopische Aufnahme der Autoradiogramme nach 30 Tagen bzw. 80 Tagen (h) Exposition und Giemsa-Färbung. A: Autosomen, F: Fäden, N: Nukleolus, K: Keulen, T: Tubulibänder.

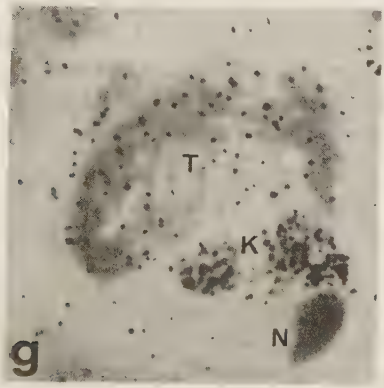


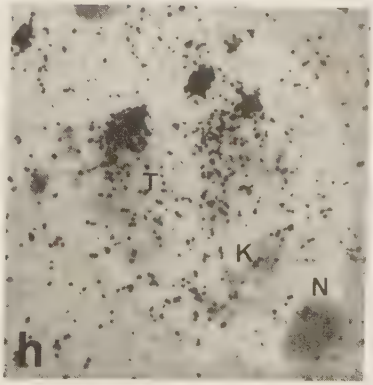

A
P
N
c


P
N
d


N
e


K
T
N
f


T
K
N
g


T
K
N
h

## 13. Analyse Y-spezifischer RNA

### 13.1. Identifizierung und Isolation

In direkter Beziehung zu der prominentesten Y-spezifischen RNA in den Kernen primärer Spermatozyten wurde RNA aus larvalen X/A.$Y^{FP}$-Hodenanlagen - sie enthalten keine postmeiotischen Zellstadien - in einem Filterhybridisierungsexperiment analysiert. Es wurden ausschließlich poly(A)-haltige Moleküle eingesetzt, um rRNA-Sequenzen zu entfernen, die insbesondere an der Position 17-19S infolge ihrer hohen lokalen Konzentration eine kompetitive Unterdrückung mit unmarkierten komplementären DNA-Sequenzen der verwendeten "Y-spezifischen" DNA-Probe unmöglich gemacht (Abb. 22b) und somit jedes andere Signal überdeckt hätten. Ein gleichzeitiger Verlust aller anderen nicht poly(A)-haltigen Sequenzen war nicht zu vermeiden.

RNA aus 600 X/A.$Y^{FP}$-Hodenanlagen wurde mittels poly(U)-Sepharose fraktioniert und die poly(A)-haltigen Sequenzen denaturiert in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde auf Nitrocellulose-Filter transferiert und mit einer "Y-spezifischen" DNA-Probe (radioaktiv markierte X/Y-DNA und eine 3000fache Menge unmarkierte X/X-DNA) unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Die Radioaktivitätsverteilung auf dem Filter (Abb. 21) läßt die Identifizierung von hauptsächlich vier Y-spezifischen RNA-Größenklassen im Bereich zwischen 12S und 35S zu.

Bei einer Isolation dieser Y-spezifischen Transkripte sollten insbesondere die Moleküle erfaßt werden, die eine regulatorische Funktion in der Spermiogenese ausüben könnten und in postmeiotischen Zellstadien zu finden sind. Da anzunehmen ist, daß die Transkripte postmeiotisch vollständig prozes-

Abbildung 21:

Poly(A)-haltige RNA aus 600 Hodenanlagen von D. hydei X/A.$Y^{FP}$-Larven, isoliert mittels poly(U)-Sepharose, denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt in einem Formaldehyd-haltigen vertikalen Agarose-Flachgel (1.2%). Nach Transfer auf Nitrocellulose-Filter erfolgte die Hybridisierung in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 40 Stunden mit einer Y-spezifischen DNA-Probe (radioaktiv markierte X/Y-DNA mit einem 3000fachen Oberschuß an unmarkierter X/X- DNA). Das Hybridisierungsmuster wurde ermittelt durch Bestimmung der Radioaktivität von 2mm breiten Filterstreifen (b). Als Größenstandards diente Tritium-markierte rRNA aus einer D. hydei Zellinie (a) (zur Verfügung gestellt von B. Eckes).

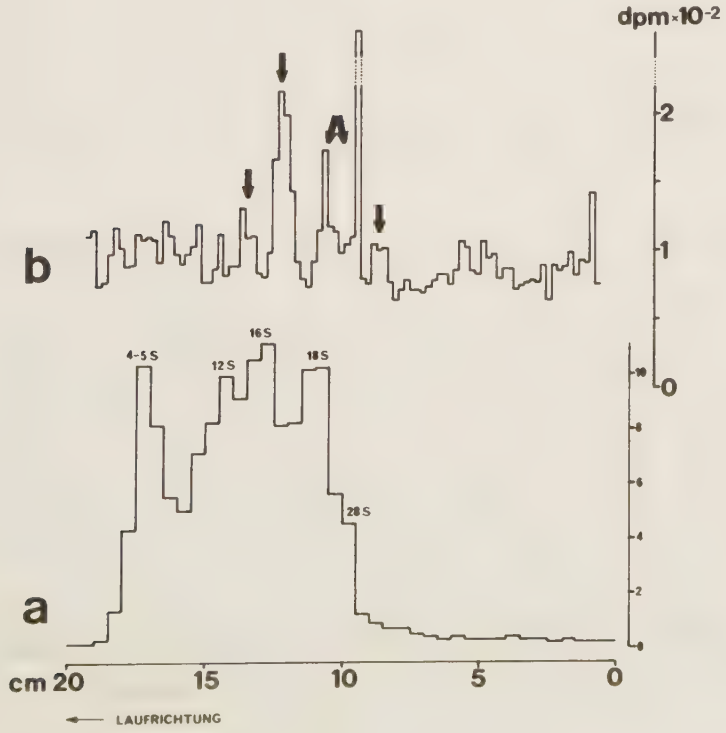


Abbildung 22:

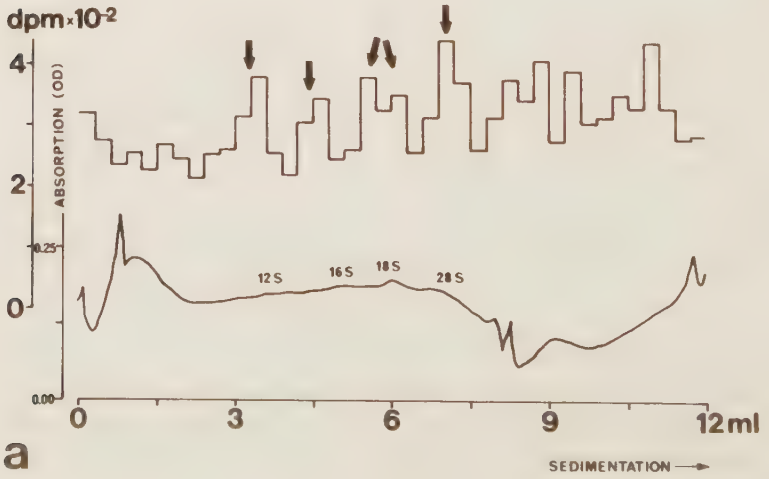
Gesamt-RNA und poly(A)-haltige RNA aus Hoden von D. hydei X/A.$Y^{FP}$-Männchen, aufgetrennt durch Zonenzentrifugation in linearen Zucker-Dichtegradienten (5-60% Saccharose in "Nexmed") im SW40Ti-Rotor bei 40000 rpm und 1°C für 7 Stunden (b,c) bzw. 14 Stunden (a) und optisch vermessen bei 254 nm.

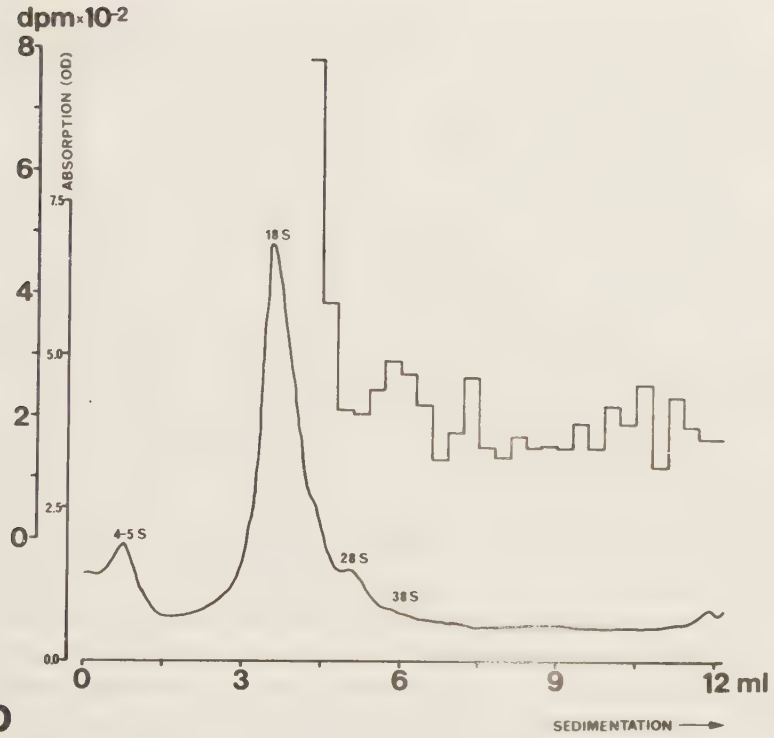
a: Poly(A)-haltige RNA aus 1000 Hoden, isoliert mittels oligo-(dT) Cellulose

b: Gesamt-RNA aus 600 Hoden, erhitzt zur Denaturierung der 28S-rRNA

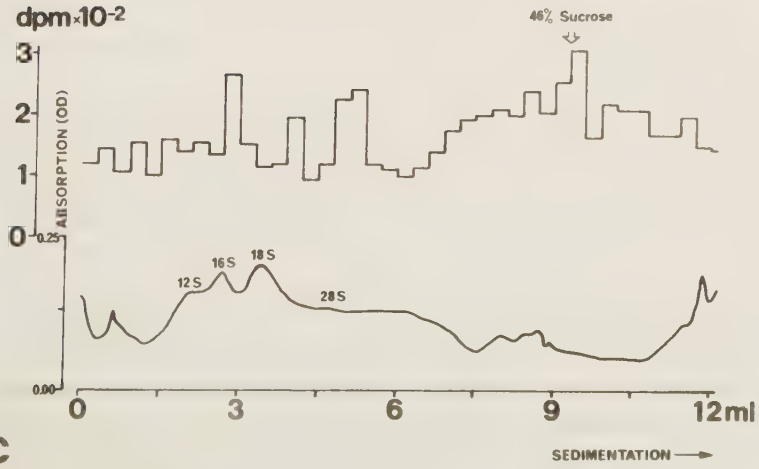
c: Poly(A)-haltige RNA aus 600 Hoden, isoliert mittels poly (U)-Sepharose

Die RNA aus 0.3 ml Fraktionen wurde an Nitrocellulose-Filtern fixiert und hybridisiert mit einer Y-spezifischen Probe (radioaktiv markierte X/Y-DNA und eine 3000fache Menge an unmarkierter X/X-DNA) in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C für 20 Stunden. Die Radioaktivitätsmenge auf jedem Filter wurde durch Flüssigkeits-Szintillationszählung bestimmt.




dpm×10-2
8
6
4
2
0
ABSORPTION (OD)
7.5
5.0
2.5
0.0
18 S
4-5 S
28 S
38 S
0
3
6
9
12 ml
SEDIMENTATION

b


dpm×10-2
46% Sucrose
3
2
1
0
ABSORPTION (OD)
0.25
0.00
12 S
16 S
18 S
28 S
0
3
6
9
12ml
SEDIMENTATION

c

siert vorliegen, wurde unter Umständen gleichzeitig die Anreicherung einheitlicher Molekulargewichte begünstigt. Für eine präparative Isolierung erschien die Verwendung von Saccharose-Dichtegradienten als optimal.

Hoden aus X/A.$Y^{FP}$-Männchen wurden auf poly(A)-haltige RNA aufgearbeitet und diese durch Zonenzentrifugation in linearen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Die Hybridisierung einzelner Fraktionen mit einer identischen "Y-spezifischen" DNA ergab eine vergleichbare Verteilung Y-spezifischer RNA-Moleküle mit vier signifikanten Molekülpopulationen (Abb. 22a, c).

Dabei stellte sich heraus, daß eine Fraktionierung der RNA mittels poly(U)-Sepharose ungeeignet war, da offensichtlich Material von der Säule zusammen mit der Probe eluiert wurde, im Zuckergradienten bei einer Dichteposition von etwa 46% Saccharose isopyknisch bandierte und in der Hybridisierung unspezifisch große Mengen DNA absorbierte (Abb. 22c). Den Beweis lieferte ein Testexperiment, wobei die Durchführung sämtlicher Prozeduren unter identischen Bedingugnen erfolgte, jedoch keine RNA eingesetzt wurde. Durch Verwendung von oligo-(dT) Cellulose zur Isolierung von poly(A)-haltiger RNA konnte dieser Hybridisierungsartefakt vermieden werden (Abb. 22a).

Eine Analyse von Gesamt-RNA aus Hoden desselben Genotyps, durchgeführt nach exakt identischen Prozeduren, war aus den erwähnten Gründe nur möglich im hochmolekularen Bereich über $1.6x10^6$ Dalton oder 30S. Es wurden keine Y-spezifischen RNA-Moleküle in nennenswerter Menge identifiziert, die in den poly(A)-haltigen RNA-Fraktion nicht zu finden waren (Abb. 22b). Durch Denaturierung der RNA vor der Zentrifugation bei 80°C für 5 min zerfallen die 28S-rRNA-Moleküle - die Stränge werden über Wasserstoffbrücken zusammengehalten - in ihre Bruchstücke von 5.8S, 17S ($0.65x\ 10^6$ Dalton) und 19S ($0.75x10^6$ Dalton), sodaß nur die wenigen hitzesta-

bilen Moleküle ohne "nick" an der Position 28S im Zuckergradienten bandieren.

## 13.2. Charakterisierung

Die bezeichneten vier Fraktionen von Transkripten aus X/A.$Y^{FP}$-Hoden wurden isoliert, und an der gesamten RNA jeder Probe erfolgte eine Synthese von $^{3}$H-cDNA. Da alle Fraktionen mit Sicherheit große Mengen X-chromosomaler und autosomaler Sequenzen enthielten, wurde zur Absicherung der Y-Spezifität zu jeder cDNA-Probe ein 10000facher Überschuß an unmarkierter X/X-DNA gegeben, um eine kompetitive Unterdrükkung angereicherter homologer Sequenzen zu gewährleisten.

Ein "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierungsexperiment an Kernen primärer Spermatozyten des X/A.$Y^{FP}$-Genotyps unter Einsatz dieser vier DNA-Proben ließ unter den gewählten Bedingungen keine Hybridisierung über "Fäden"-Matrix und "Pseudonukleolus" erkennen. Die spezifische Radioaktivität der synthetisierten cDNA lag bei $6 \times 10^{6}$ dpm $^{3}$H/µg. Da pro Präparat zur Hybridisierung nur etwa $1.5 \times 10^{5}$ dpm eingesetzt wurden, und in Anbetracht der Tatsache, daß vermutlich ein überwiegender Teil X-chromosomale und autosomale Sequenzen darstellten, kann das negative Resultat des Experimentes - nach einer Expositionszeit von 3 Wochen - in dem Einsatz zu geringer Mengen Y-spezifischer DNA-Sequenzen begründet sein.

Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, daß die Y-spezifischen Transkripte am "Pseudonukleolus" in ihren Molekulargewichten sehr heterogen sind, oder daß extrem große Moleküle bei der Isolierung mechanisch zerstört wurden. Die daraus folgende breite Verteilung in gelelektrophoretischen Trennungen oder Sedimentationsanalysen ließe ihre Erfassung

nicht zu bzw. ihre lokale Konzentration wäre für nachfolgende Analysen zu gering. Die in den vorstehend beschriebenen Hybridisierungsexperimenten (IV.13., 13.1.) identifizierten vier Fraktionen wären unter diesen Umständen zu deuten als das Resultat einer nicht Y-spezifischen Hybridisierung. X-chromosomale und autosomale Sequenzen, die von einheitlichen Größen und zudem an diesen Positionen angereichert sind, würden möglicherweise durch die eingesetzte Menge komplementärer unmarkierter DNA-Sequenzen in der Probe nicht vollständig auskompetiert.

Eine schlüssige Aussage kann somit an dieser Stelle noch nicht gemacht werden. Experimente zur Klärung dieses Problems sind eingeleitet.

# V. DISKUSSION

## 1. Y-chromosomale Lampenbürstenschleifen in Keimzellen: Thesen und Resultate

Das Lampenbürstenstadium von Chromosomen, zu beobachten während der meiotischen Prophase in vielen Tierarten, demonstriert die genetische Aktivität einzelner chromosomaler Abschnitte und ist möglicherweise von entscheidender Bedeutung für den Ablauf von Differenzierungsprozessen postmeiotischer Zellstadien. In primären Spermatozyten von D. hydei bildet das Y-Chromosom lichtmikroskopisch sichtbare Schleifenstrukturen aus, deren vollzähliges Vorhandensein essentiell ist für die Produktion motiler Spermien, das Fehlen einer oder mehrerer Y-chromosomaler Schleifen bewirkt Sterilität der Tiere (Hess, 1967, 1968, 1970, 1974). Die Lampenbürstenschleifen werden daher als die morphologische Manifestation für die genetische Aktivität der sogenannten "Fertilitätsfaktoren" angesehen.

Verbunden mit der Ausbildung der Schleifenstrukturen ist die Synthese von RNA; ihre Inhibierung durch Actinomycin D, alpha-Amanitin oder Röntgenbestrahlung führt zu einer reversiblen Degradation der Schleifen (Hess, 1965; Meyer und Hess, 1965; Lassak, 1975). Autoradiographische Befunde bestätigten die Anwesenheit von Transkripten an den Schleifen (Hennig, 1967), zudem zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen eine Transkription von "giant" RNA-Molekülen an den diffusen Bereichen der "Fäden" (Glätzer und Meyer, 1981).

Transkripte an den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen konnten als Ribonukleoprotein-Fraktion aus Kernen primärer Spermatozyten isoliert werden (Kloetzel, 1979; Knust,

1979), jedoch waren beim Vergleich der RNA solcher RNP-Fraktionen aus X/O- und X/Y-Genotypen keine Y-spezifischen Sequenzen nachweisbar (Knust, 1979). Die von Hennig (1968) beschriebene Existenz einer als repetitiv charakterisierten Y-chromosomalen RNA wurde 1978 widerrufen: "No defined RNA fractions from Y chromosomal sequences are available." (Hennig, 1978).

Inzwischen scheint unzweifelhaft, daß das Y-Chromosom reitterierte Sequenzen besitzt, die ebenfalls auf Autosomen und/oder X-Chromosom zu finden sind und offensichtlich in der männlichen Keimbahn transkribiert werden. Eine RNA-Präparation X-chromosomaler und autosomaler Sequenzen aus X/O-Spermatozytenkernen weist zahlreiche Homologien zu Y-chromosomaler DNA auf (Knust, 1979). Dies mag eine Erklärung dafür sein, daß es bisher nicht gelungen ist, genetisch aktive DNA-Sequenzen, die spezifisch für das Y-Chromosom, d.h. ausschließlich auf dem Y-Chromosom befindlich sind, zu isolieren (Lifschytz, 1979; Vogt et al., 1982).

Weitere Ursachen für wiederholte Fehlschläge molekularer Analysen sind offenbar zu suchen in der Anwendung von Techniken, die unreproduzierbare und artefizielle Resultate liefern. Eine Identifizierung Y-spezifischer DNA-Moleküle in Filterhybridisierungsexperimenten bei Einsatz einer geeigneten DNA-Probe (radioaktiv markierte DNA aus X/Y-Männchen mit einem großen Überschuß an kompetitiv zugegebener X/O- oder X/X-DNA, um die Hybridisierung der X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen zu unterdrücken) scheiterte an unkontrollierbaren Reaktionen, die eine eindeutige Auswertung der Daten unmöglich machten (III.6.1.). Kontrollierte Hybridisierungen, durchgeführt mit einer entsprechenden cRNA-Probe, ergaben sehr heterogene Hybridisierungsmuster (Mischke, 1978) und kaum die Möglichkeit einer umfassenden Analyse, zudem waren über die genetische Aktivität der identifizierten DNA-Sequenzen keine Aussagen zu machen.

Zum Nachweis der Existenz Y-spezifischer DNA-Sequenzen, die in der meiotischen Prophase der Spermatogenese transkribiert werden, sollte ein Filterhybridisierungsexperiment unter Einsatz einer "Y-spezifischen" RNA-Probe führen (IV.8.). Radioaktiv markierte RNA aus D. hydei X/Y/Y-Hodenanlagen, versetzt mit einem großen Überschuß an unmarkierter RNA aus X/O-Männchen - zwecks kompetitiver Unterdrückung der Hybridisierung von X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen - , wurde hybridisiert auf "Southern blots" von Eco RI-behandelter und gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA aus Genotypen mit unterschiedlichen Y-chromosomalen Anteilen. Die Hybridisierungsmuster auf den Nitrocellulose-Filtern erlaubten eine Identifizierung zahlreicher Y-chromosomaler und codierender DNA-Sequenzen und ließen damit erstmals auf eine tatsächliche Existenz Y-spezifischer Transkripte schließen (Abb. 15). Einzelne DNA-Fragmente konnten Y-chromosomalen Abschnitten zugeordnet und diese zum ganzen Y-Chromosom aufsummiert werden.

Als Kontrolle der Hybridisierungsreaktion wurde ein Filter mit fixierter, identisch behandelter X/O-DNA eingesetzt. Er zeigte keinerlei Hybridisierung mit radioaktiven Molekülen der RNA-Probe, sodaß die Spezifität der erhaltenen Resultate als bewiesen gelten kann.

Aufgrund der Daten ist als gesichert anzusehen, daß keine X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen existieren, die einer Transkriptionskontrolle durch das Y-Chromosom unterliegen, und daß die hybridisierten RNA-Sequenzen Y-chromosomal codiert sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß gerade diese Sequenzen jenes oben erwähnte Phänomen aufweisen, auf dem Y-Chromosom in redundanter Zahl und auf dem X-Chromosom und/oder den Autosomen in geringer Kopienzahl vorzuliegen. In diesem Fall würde die Menge kompetierender, unmarkierter Transkripte aus dem X/O-Genotyp nicht ausreichen zur Absättigung komplementärer Y-chromosomaler Sequenzen, und Signale hybridisierender radioaktiv markierter Mo-

leküle aus der X/Y/Y-Konstitution wären die Folge. Da jedoch die Hybridisierungsmuster in guter Übereinstimmung reproduziert werden konnten, schien dieser Effekt zumindest nicht von großem Einfluß zu sein, sodaß eine Existenz Y-spezifischer Transkripte mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden konnte.

## 2. Hybridisierungsexperimente: Techniken und Reaktionen

Eine Analyse von RNA sollte die Existenz genetisch aktiver, Y-spezifischer DNA-Sequenzen beweisen und gleichzeitig eine Isolierung dieser Y-spezifischen Transkripte erlauben. Das Experiment wurde zunächst unter Einsatz des üblicherweise verwendeten DBM-Papiers zur Fixierung von RNA in sogennanten "Northern blots" durchgeführt mit einer zur Identifizierung Y-spezifischer Sequenzen geeigneten DNA-Probe (radioaktiv markierte X/Y-DNA mit einer 2000fachen Menge an unmarkierter X/O-DNA), wobei Rezepturen der Herstellerfirmen des Papiers, basierend auf Vorschriften von Alwine et al. (1977), exakt befolgt wurden. Das Resultat war eine Radioaktivitätsverteilung, die im wesentlichen der RNA-Mengenverteilung auf den Filtern entsprach (Abb. 13). Es waren keine eindeutigen Aussagen möglich und mehrere Ursachen wurden diskutiert, die zu solch einem Hybridisierungsmuster führen könnten.

Einer heterogenen Größenverteilung von RNA kann eine mechanische Zerstörung hochmolekularer Transkripte zugrunde liegen; ebenso liefern im Stadium ihrer Synthese oder während verschiedener Prozessierungsschritte isolierte Moleküle keine einheitlichen Größenklassen. Ferner war die Existenz Y-spezifischer Transkripte bislang nur eine Annahme und möglicherweise nicht der Realität entsprechend.

Einen entscheidenden Nachteil für die Untersuchungen brachte

die Verwendung von DBM-Papier mit sich, das durch Bandenunschärfe, geringe und uneinheitliche Bindungskapazität, unspezifische DNA-Absorption und Erhöhung des Hybridisierungs-Backgrounds eine Erfassung geringer Molekülmengen verhindert.

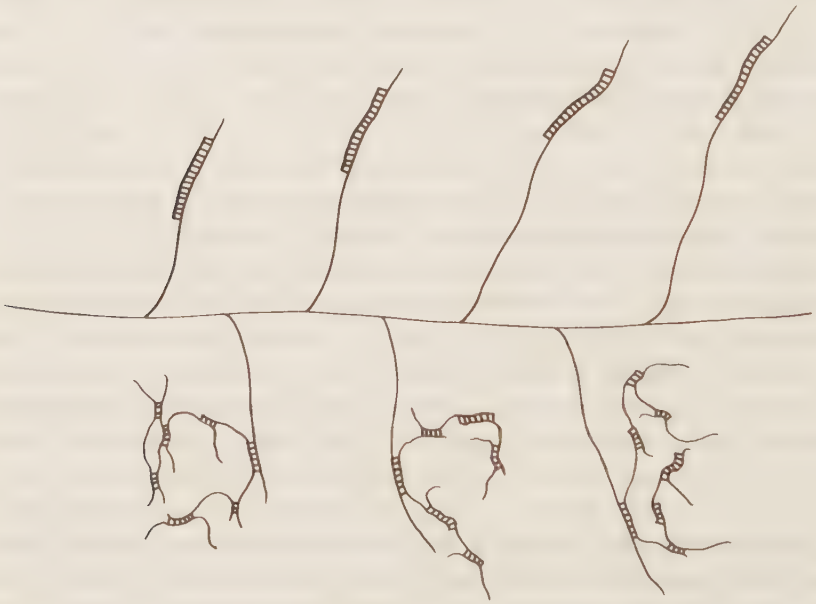
Eine Identifizierung Y-spezifischer Transkripte war also bei Anwendung herkömmlicher molekularbiologischer Techniken, wie vorstehend beschrieben und diskutiert, nicht durchführbar.

Die Technik der "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung (Pukkila, 1975) sollte durch Einsatz geeigneter DNA-Proben die Identifizierung und Lokalisierung komplementärer RNA-Sequenzen erlauben. Sie erschien als Methode der Wahl, da selbst Transkripte extremer Größe und/oder heterogener Molekulargewichte erfaßt werden.

Bei Anwendung der "in situ"-DNA/RNA-Hybridisierungstechnik zeigten sich in geeigneten und eindeutigen Kontrollexperimenten die Unzulänglichkeiten dieser Prozedur, die in der Vergangenheit - eingesetzt zum Studium von Organisation und Transkription von Lampenbürstenchromosomen in Amphibien-Oozyten - weltweit offensichtlich zu Misinterpretationen und widersprüchlichen Daten führten (Pukkila, 1975; Old, Callan und Gross, 1977; Callan und Old, 1980; Macgregor, 1980). Sie traten auf als Folge oftmals nicht exakt definierter und kontrollierter Hybridisierungsreaktionen. Die allgemein angewandten Bedingungen von 3xSSC in 40% Formamid bei 40°C und 4xSSC in 50% Formamid bei 37-40°C erlauben extrem hohe Wechselwirkungen und ergaben daher trotz geringer spezifischer Aktivitäten der eingesetzten DNA-Proben ($1\text{-}3\times10^6$ dpm/µg; $2.5\text{-}15\times10^3$ cpm pro Präparat) nach kurzen Expositionszeiten intensive - aber nicht spezifische! - Signale. Die Existenz unvollständig hybridisierter Moleküle und die Reaktion ihrer einsträngigen Enden mit weiteren Molekülen aus der Probe würde die Entstehung riesiger DNA-Netzwerke erklären, wobei in statistischer Auswahl - je nach Menge der kom-

Abbildung 23:

Darstellung eines Modells für "Netzwerk"-Bildung. An einer DNA-Achse befinden sich naszierende Transkripte mit vollständig hybridisierenden Sequenzen (oben) bzw. nicht über ihre ganze Länge paarenden Sequenzen (unten), sodaß an die einsträngig überstehenden Enden mit weiteren Molekülen hybridisieren.



petitiv eingesetzten DNA-Sequenzen - auch radioaktiv markierte Moleküle gebunden werden (Abb. 23).

Die Existenz dieser Netzwerke wurde demonstriert durch ein geeignetes Hybridisierungsexperiment. Polytäne Chromosomen aus D. hydei Speicheldrüsen wurden hybridisiert mit einer komplexen DNA-Probe, die ausschließlich eine Markierung Y-spezifischer Sequenzen erlaubt (diese "Y-spezifische" Probe wurde hergestellt wie oben beschrieben). Unter DNA/DNA-Hybridisierungsbedingungen - 2xSSC bei 69°C - resultiert eine intensive Markierung der euchromatischen Anteile der Autosomen und des X-Chromosoms (Abb. 4), hervorgerufen durch unkontrollierte Bindung von DNA-Moleküle aus der Probe.

Das gleiche Resultat zeigte sich bei Einsatz einer identischen DNA-Probe zum Zweck einer DNA/RNA-Transkripthybridisierung unter den allgemein verwendeten Bedingungen 4xSSC, 50% Formamid und 42°C. Ein Spermatozytenkern der genetischen Konstitution X/O, der keine Y-chromosomale DNA besitzt, weist nach Hybridisierung mit der "Y-spezifischen" Probe intensive Signale auf (Abb. 3), die nicht das Resultat von DNA/RNA-Reaktionen sein können und eindeutig als Artefakte zu klassifizieren sind.

Anhand dieser Daten wird klar, daß eine korrekte Interpretation aller bisherigen, unter diesen Bedingungen (Alwine et al., 1977) durchgeführten DNA/RNA-Filterhybridisierungsexperimenten unmöglich ist. Die intensiven DNA/DNA-Wechselwirkungen führen zu einer Radioaktivitätsverteilung, die nicht nur den Kriterien der eingesetzten DNA-Probe entspricht, sondern von quantitativen Effekten - Menge der fixierten RNA, Anzahl kompetierender Sequenzen und DNA-Konzentration in der Probenlösung - überlagert ist. Gleiche Prozesse führen bei DNA/DNA-Filterhybridisierungen zu unauswertbaren Resultaten.

## 3. Theorie spezifischer Hybridbildung und Einsatz der "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierungstechnik

Berechnungen anhand der von Schildkraut und Lifson (1965) und Thomas, White und Davis (1976) erstellten Daten verdeutlichen die hier vorliegenden Stabilitäten von DNA/RNA- und DNA/DNA-Hybriden: Optimale Temperaturen für die ausschließliche Bildung von DNA/RNA-Hybridmolekülen lägen für D. hydei DNA (durchschnittlicher G+C-Gehalt: 41.8%) in 4xSSC und 50% Formamid bei $T_{max}$=70°C, in 3xSSC und 40% Formamid bei $T_{max}$=74.5°C. Die allgemein verwendeten Hybridisierungstemperaturen von 37-40°C lagen um mehr als 30°C unter diesen berechneten Werten und erlaubten keine Differenzierung zwischen DNA/RNA- und DNA/DNA-Reaktionen.

Die Schmelzanalyse von mitochondrieller D. hydei DNA (durchschnittlicher G+C-Gehalt: 28.9%) in 4xSSC und 50% Formamid ergab einen Schmelzbereich von 36-70°C. Das bedeutet: bei 40°C wird der weitaus größte Teil einer denaturierten Probe DNA/RNA- und/oder DNA/DNA-Hybride bilden, ein kleiner Teil der DNA - hauptsächlich A+T-reiche Sequenzen - liegt geschmolzen vor, sowohl in der Probe als auch im Präparat.

Den Beweis hierfür lieferte ein "in situ"-DNA/RNA-Hybridisierungsexperiment an Speicheldrüsenpräparaten. Eine definierte DNA-Probe, bestehend aus D. hydei rDNA (kloniert in dem Vektor pBR 322), radioaktiv markiert und hybridisiert in 4xSSC und 50% Formamid bei 42°C, führte zu einer intensiven Markierung Ribonuklease-behandelter Nukleoli (Abb.10d). Die Ursache war die Hybridisierung der radioaktiv markierten rDNA mit rRNA-Genen im Chromozentrum der Speicheldrüsenkerne. Das Zytoplasma der Zellen blieb - im Gegensatz zum unbehandelten Präparat - frei von Silberkörnern, da sämtliche Ribosomen nach Proteinase- und Ribonuklease-Behandlung zerstört waren.

Diese Resultate demonstrieren eine weitere Ursache für die Entstehung artefizieller Signale, die - in Unkenntnis der tatsächlich ablaufenden Hybridisierungsreaktionen - zu Mißdeutungen führen. So wurde bei Anwendung der "Pukkila-Technik" und Hybridisierung in 4xSSC und 50% Formamid bei 40°C der ausschließliche Ablauf von DNA/RNA-Reaktionen vorausgesetzt auf der Basis einer nicht erfolgten vorherigen Denaturierung der DNA mit NaOH (Pukkila, 1975). Parallel wurden unter identischen Bedingungen DNA/DNA-Hybridisierungsexperimente durchgeführt nach einer NaOH-Behandlung der Präparate. Da jedoch in 4xSSC und 50% Formamid schon bei 40°C DNA-Doppelstränge schmelzen - wie durch die beschriebenen Experimente eindeutig nachgewiesen - , sind nicht nur DNA/RNA-Hybridmoleküle zu erwarten (ihre Bildungsrate ist zudem aufgrund der niedrigen Temperatur weit unterhalb des Reaktionsoptimums), sondern gleichzeitig DNA/DNA-Hybride großer Stabilitäten.

Die für diese "in situ"-DNA/RNA-Hybridisierungen angeführten Kontrollexperimente beruhten auf Desoxyribonuklease- bzw. Ribonuklease-Behandlungen. Sie waren offensichtlich ungeeignet und nicht ausreichend, da sie diese unspezifischen Reaktionen nicht erkennen ließen. Die vorliegenden Daten fordern zum einen die Anwendung von Hybridisierungsbedingungen, die DNA/DNA-Wechselwirkungen absolut ausschließen, und zum anderen eine eindeutige Absicherung der Reaktionsbedingungen und der Spezifität der Resultate durch geeignete Kontrollexperimente.

Nach Casey und Davidson (1977) nimmt mit steigender Formamid-Konzentration in der Hybridisierungslösung die Stabilität von DNA/DNA-Hybridmolekülen schneller ab als die von DNA/RNA-Hybriden. Die Differenzen ihrer Stabilitäten sind bei hohen Formamid-Konzentrationen maximal, sodaß in bestimmten Temperaturbereichen DNA/DNA-Reaktionen zu vernachlässigen sind bei gleichzeitiger optimaler Bildung von DNA/RNA-Hybriden. Anhand der von Schildkraut und Lifson (1965)

erstellten Formeln und der Daten von Thomas et al. (1976) läßt sich in 70% Formamid mit einer Salzkonzentration von 1xSSC für das D. hydei Genom die Temperatur der maximalen Bildungsrate von DNA/RNA-Hybridmolekülen bei größtmöglichen Stabilitäten errechnen : $T_{max}$=48.6°C, wobei die optimale Reaktionstemperatur nach Thomas et al. (1976) 1-4°C niedriger, also bei etwa 46°C liegt.

Die tatsächlich ablaufenden Reaktionen wurden durch praktische Anwendung dieser Bedingungen analysiert. Die Resultate von Schmelzanalysen für DNA/DNA-Duplexmoleküle in Lösungen unter verschiedenen Salz- und Formamid-Konzentrationen (Abb. 5, Tab. 6) und von speziell auf das hier vorliegende Problem gerichtet erstellte "Schmelzprofile" von DNA/RNA-Hybriden an Spermatozytenkern-Präparationen (Abb. 7) zeigen weitgehende Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. Die Hybridisierungsreaktionen zwischen DNA-Probe und zytologischem Präparat waren exakt kontrollierbar durch Einsatz einer definierten DNA-Sequenz in Form klonierter rDNA bzw. einsträngiger cDNA, die sequenzhomolog zum 38S-rRNA-Precursormolekül war und DNA/DNA-Wechselwirkungen ausschloß. Die Schmelzbereiche der DNA/RNA-Hybride lagen von weniger als 36°C bis etwa 60°C, also trotz etlicher undefinierter Parameter - Basen-"mispairing" der Hybride, geringe Molekülläge, Ionenkonzentration und beeinflussende Substanzen am Reaktionsort (III.3.3.) - durchaus um den berechneten Wert $T_{max}$ von 46-49°C.

Die Überprüfung des tatsächlich vollständigen Ausschlusses von DNA/DNA-Reaktionen unter den Bedingungen 1xSSC, 70% Formamid und 46°C erfolgte durch Hybridisierung der schon verwendeten "Y-spezifischen" DNA-Probe an polytänen Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsen und an Kernen primärer Spermatozyten des X/O-Genotyps. An den polytänen X-Chromosomen und Autosomen findet keine Hybridisierung statt (Abb. 8), ebenso zeigen die Spermatozytenkerne keine Markierung, weder über den Autosomen, noch an den sichtbaren RNP-Struk-

turen im Kernraum (Abb. 17a). Auch über Ribonuklease-behandelten Nukleoli von polytänen Speicheldrüsenzellen, hybridisiert mit radioaktiv markierter rDNA unter identischen Bedingungen, sind keine Silberkörner zu finden (Abb. 10b).

Somit ist gesichert, daß in Anwendung der stringenten Bedingungen weder mit dem Präparat noch in der Probe selbst unkontrollierte DNA/DNA-Wechselwirkungen stattfinden - in guter Übereinstimmung lag die mitochondrielle DNA in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C nahezu vollständig geschmolzen vor - und sämtliche Sequenzen zur Hybridisierung zur Verfügung stehen.

Die Hybridisierungsbedingungen zur Anwendung auf eine Identifizierung Y-spezifischer Transkripte in den Spermatozytenkernen wurden nach theoretischen Abschätzungen an das System angepaßt, da weder die Basenzusammensetzung und -sequenz noch die Größe und Komplexität der gesuchten Moleküle bekannt war. Eine DNA/RNA-Hybridisierung mit der beschriebenen "Y-spezifischen" DNA-Probe an Kernen primärer Spermatozyten in Gegenwart von 70% Formamid in 1xSSC bei 46°C ergibt eine spezifische Markierung der Lampenbürstenschleifen, gleichzeitig bleiben die Autosomen - besonders gut sichtbar in jungen Kernen - ohne Signal (Abb. 17c, d, 19a).

Bei der Durchführung der Experimente wurde für die Hybridisierung in 1xSSC und 70% Formamid eine Temperatur von 46°C bevorzugt und eine anschließende Behandlung bei 48°C in identischer Lösung vorgenommen. Diese optimale Anpassung der Reaktionsbedingungen an das System ergibt bei gleichbleibend intensiver und spezifischer Hybridisierung und minimaler Zahl an Background-Silberkörnern ein besonders günstiges Signal:Background-Verhältnis.

## 4. Interpretation von Autoradiogrammen

Das Resultat eines "in situ"-Hybridisierungsexperimentes präsentiert sich mit einer bestechenden Anschaulichkeit, da es eine sofortige Zuordnung radioaktiver Signale und somit identifizierter Sequenzen zu zytologisch sichtbaren Strukturen erlaubt.

Vorausgesetzt, daß geeignete, aber gleichzeitig stringente Hybridisierungsbedingungen in Abhängigkeit von Basenzusammensetzung und -sequenz, von Größe und Komplexität der Moleküle angewendet wurden, sollte die Spezifität der Signale gegeben sein. Doch zusätzlichen oder teilweise sogar entscheidenden Einfluß auf die Intensitäten der Signale üben zahlreiche Parameter innerhalb der Prozeduren solch eines Hybridisierungsexperimentes aus. Nur durch ihre strenge Beachtung und Definition kann die Reproduzierbarkeit und somit eine Vergleichbarkeit der Resultate gesichert werden (III.5.).

Eine gute Zugänglichkeit der Sequenzen im Präparat erfordert eine hervorragende Qualität der Präparation - d.h. eine flache Quetschung bei Erhaltung charakteristischer Strukturen - und die Entfernung maskierender Proteine, beispielsweise durch enzymatische Behandlung. Eine hohe spezifische Aktivität der eingesetzten Probe und eine möglichst große Konzentration der betreffenden Sequenzen im Hybridisierungsvolumen sind wichtige Voraussetzungen für eindeutige Resultate. Die Rate der Hybridbildung wird entscheidend verbessert - vor allem bei Proben hoher DNA-Konzentration und Viskosität - durch Reduktion der Moleküllängen zur Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit und durch Wahl eines optimalen Reaktionsraumes über dem Präparat, um die Diffusionswege zu verkürzen (III.5.3.). Zuletzt sind Güte der Filmschicht und Expositionszeit von großem Einfluß auf das Resultat.

Bei optimaler Wahl sämtlicher Parameter sind große Signalintensitäten bei hoher Spezifität zu erzielen. Trotzdem ist keine Aussage zu machen über Menge und Komplexität der identifizierten Moleküle, da ihre Verteilung, d.h. ihre lokale Konzentration, die Entstehung von Signalen bestimmt.

Am Beispiel der rDNA/rRNA-Hybridisierungsexperimente, sowohl an Speicheldrüsen- (Abb. 10) als auch an Spermatozytenkernen (Abb. 11), wird deutlich, daß selbst eine Vielzahl von Molekülen einheitlicher Sequenz bei Verteilung über einen größeren Bereich zu keinem signifikanten Signal, sondern bestenfalls zu einer diffusen Markierung führt. Diese Resultate wurden erstmals erhalten durch Anwendung stringenter DNA/RNA-Hybridisierungsbedingungen (1xSSC und 70% Formamid bei 46°C), wobei eine statistische Auswahl aller rRNA-Moleküle erfaßt wird. Erstaunlicherweise ist über den Nukleoli der Spermatozytenkerne kein prominentes Signal zu erkennen (Abb. 11d, e, f). Erst eine Hybridisierung unter Ermöglichung von DNA/DNA-Reaktionen, durchgeführt nach bisher üblichen Bedingungen (4xSSC und 50% Formamid bei 42°C), zeigt ein Hybridisierungsmuster mit starker Markierung der Nukleoli (Abb. 11a, b, c).

Die lokale Konzentration der rRNA-Moleküle im Kern einer primären Spermatozyte ist im Bereich des Nukleolus nicht höher als im Kernraum. An einigen Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen - der "Fäden"-Matrix, den "Tubulibändern" und insbesondere den "Keulen" - sind sogar stärkere Markierungen zu beobachten. Die an den Nukleolus-Organisatoren synthetisierte rRNA wird offensichtlich nicht im Nukleolus akkumuliert, sondern in den Kernraum transportiert.

Die Speicheldrüsenpräparate zeigen bei ausschließlicher Markierung der rRNA keine höhere lokale Konzentration der Moleküle am Nukleolus als im Zytoplasma (Abb. 10a). Zusätzliche DNA/DNA-Reaktionen erhöhen die Hybridisierungsrate am Nukleolus (Abb. 10c).

Es kann als gesichert angesehen werden, daß die unter stringenten Bedingungen beobachteten Hybridisierungsmuster der realen Verteilung ribosomaler RNA-Moleküle entsprechen, da selbst reine poly(A)-Sequenzen unter identischen Bedingungen erfaßt wurden (Abb. 9).

Die Daten dieser Hybridisierungsexperimente, durchgeführt am Beispiel der rRNA als großer Molekülpopulation einheitlicher Sequenz, demonstrieren die Unzulässigkeit von Aussagen über die Menge hybridisierender Moleküle in Relation zu den erzeugten Signalen. Eine hohe Anreicherung solcher Sequenzen liefert ein starkes Signal, wohingegen eine diffuse Verteilung selbst einer großen Menge entsprechender Moleküle eine schlüssige Aussage kaum ermöglicht.

## 5. "In situ"-Hybridisierung an Lampenbürstenschleifen und Y-spezifische Transkripte

Der Nachweis Y-spezifischer Transkripte gelang mit Hilfe einer geeigneten DNA-Probe unter kontrollierten Hybridisierungsbedingungen.

In der "Y-spezifischen" DNA-Probe waren alle X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen einer radioaktiv markierten DNA aus X/Y-Männchen auskompetiert durch in großem Überschuß zugegebene unmarkierte DNA aus X/O- oder X/X-Genotypen, sodaß ausschließlich Sequenzen spezifisch für das Y-Chromosom in der Hybridisierung ein radioaktives Signal ergaben. Eindeutige und jede Misinterpretation ausschließende Kontrollexperimente waren möglich durch die genetischen Variationsmöglichkeiten des Systems (IV.10).

DNA/RNA-Transkripthybridisierungsexperimente mit der beschriebenen "Y-spezifischen" DNA-Probe an die Y-chromosoma-

len Lampenbürstenschleifen unter stringenten Bedingungen (1xSSC und 70% Formamid bei 46°C) führten zu schleifenspezifischen Markierungen unterschiedlicher Intensitäten (Abb. 17). Das prominenteste Signal war am "Pseudonukleolus" zu beobachten, die "Tubulibänder" waren oft ebenfalls stark markiert, die Keulen wiesen einige Silberkörner auf, bei langen Expositionszeiten ebenso die "Fäden" mancher Kerne. Die punktförmigen Markierungen in Nähe der Nukleolus könnten eine Hybridisierung über den "Schlingen" darstellen, die in Lebendpräparaten nur selten und in fixierten Präparaten nicht zu identifizieren sind.

Mit Hilfe geeigneter Kontrollen wurde die Spezifität der Hybridisierungen sowohl für DNA/RNA-Reaktionen als auch für die Erfassung ausschließlich Y-chromosomaler Sequenzen und für ihre Herkunft hinsichtlich einzelner Y-Chromosom-Fragmente überprüft.

Der Nachweis für eine DNA/RNA-Hybridisierung wurde anhand eines Ribonuklease-behandelten Präparates (Abb. 17b) erbracht, gleichzeitig sei nochmals auf die an polytänen Chromosomen demonstrierte Abwesenheit von DNA/DNA-Reaktionen (Abb. 8; Abb. 10b) verwiesen. Die Spezifität der DNA-Probe für ausschließlich auf dem Y-Chromosom codierte Sequenzen wurde erzielt durch erschöpfende Absättigung sämtlicher Transkripte X-chromosomaler und autosomaler Herkunft mit komplementären, unmarkierten Molekülen: Spermatozytenkerne vom X/O-Genotyp ohne Y-Chromosom zeigen keine Hybridisierung mit radioaktiven Sequenzen (Abb. 17a), und in X/A.$Y^{FP}$-Spermatozytenkernen wird die Hybridisierung am "Pseudonukleolus" selbst mit einem 10000fachen Überschuß an unmarkierter X/O-DNA im Vergleich zu einem 2000fachen Überschuß nicht reduziert. Auf der Basis dieser Resultate ist die Y-Spezifität der identifizierten RNA-Moleküle gesichert.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die Codierung der Y-spezifischen Transkripte an jeder einzelnen Schleife durch

den jeweiligen Y-chromosomalen Abschnitt erfolgt.

Zytogenetische Analysen lieferten den Befund, daß die charakteristische Morphologie jeder Schleife autonom - ohne Einfluß der genetischen Konstitution von X-Chromosom oder Autosomen - entsteht (Hess, 1968, 1970, 1971, 1974; Schäfer, 1975, 1978).

Anhand der "in situ"-Hybridisierungen kann eine definitive Aussage über den Ort der Transkription jener an den Schleifen identifizierten RNA-Moleküle nicht erfolgen, da die Erfassung ausschließlich naszierender Transkripte nicht gewährleistet ist. Jedoch wurde durch Einsatz geeigneter DNA-Proben nachgewiesen, daß die Transkripte am "Pseudonukleolus" komplementär sind zu Sequenzen des $Y^{FP}$-Fragmentes und die Transkripte an "Keulen" und "Tubulibändern" im $Y^{S.KT}$-Fragment des Y-Chromosoms codiert sind (Abb. 18). Die verwendeten DNA-Proben enthielten radioaktiv markierte X/Y-DNA und einen großen Überschuß an entweder X/A.$Y^{FP}$- oder X/$Y^{S.KT}$-A-DNA.

Die Spezifitäten dieser DNA-Proben für Sequenzen des $Y^{S.KT}$- oder $Y^{FP}$-Fragmentes bzw. bei kompetitiver Zugabe von X/O-DNA für beide Y-chromosomale Teile wurden durch Hybridisierung auf Metaphase-Chromosomen überprüft und für die gewählten Bedingungen bestätigt durch entsprechende Markierung der einzelnen Y-chromsomalen Abschnitte (Abb. 16).

Dieses Resultat konnte allerdings nur erhalten werden durch Wahl einer nicht zu langen Expositionszeit. Die für diese DNA/DNA-Hybridisierung angewandten Bedingungen erlauben Wechselwirkungen zwischen hybridisierten DNA-Sequenzen und Molekülen der Probe, sodaß nach längerer Exposition über allen Chromosomen Signale aufgetreten wären. Außerdem ist anzunehmen, daß es sich bei den identifizierten Sequenzen um wenig komplexes, repetitives Material handelt, und daß Sequenzen geringer Größe oder Anzahl nicht sichtbar wurden.

Die durchgeführten DNA/RNA-Transkripthybridisierungen erfaßten mit Sicherheit ebensowenig sämtliche Y-spezifischen Moleküle, doch waren differenzierte Analysen möglich. Aufgrund der erhaltenen Resultate liegt die Schlußfolgerung nahe, daß die an den Lampenbürstenschleifen identifizierten Y-spezifischen RNA-Moleküle für jede einzelne Schleife spezifisch sind und dort synthetisiert werden.

Es ist jedoch anhand dieser Experimente nicht vollständig auszuschließen, daß einige wenige codierende Sequenzen beider Y-chromosomaler Fragmente identisch sind. Obwohl beispielsweise bei Hybridisierung mit einer "$Y^{FP}$-kompetierten" DNA-Probe (radioaktive X/Y-DNA mit einem 2000fachen Oberschuß an X/A.$Y^{FP}$-DNA) keine Markierung des "Pseudonukleolus" erfolgte, könnten einzelne homologe Sequenzen auch auf dem $Y^{S.KT}$-Fragment existieren; sie würden auskompetiert werden und nicht erkennbar sein. Solche geringen Homologien zwischen codierenden Regionen der beiden Y-chromosomalen Abschnitte sind auch bei Einsatz einer "$Y^{S.KT}$-kompetierten" DNA-Probe (radioaktive X/Y-DNA mit einem 2000fachen Oberschuß an X/$Y^{S.KT}$-A-DNA) nicht nachzuweisen: die Hybridisierung am "Pseudonukleolus" ist gegenüber der Markierung mit einer "Y-spezifischen" DNA-Probe nicht merklich verringert.

Exakte quantitative Bestimmungen sind in diesen Hybridisierungsexperimenten aufgrund der diskutierten Daten und Oberlegungen (V.4.) nicht möglich. Doch scheint die Annahme gerechtfertigt, daß die Y-spezifischen Transkripte am "Pseudonukleolus" in ihrer wesentlichen Menge im $Y^{FP}$-Abschnitt des Y-Chromosoms codiert und weitgehend für dieses Y-Fragment spezifisch sind. Gleiches gilt für "Keulen" und "Tubulibänder": die dort lokalisierten Y-spezifischen RNA-Moleküle scheinen - soweit mit dieser Technik zu erfassen - spezifisch für das $Y^{S.KT}$-Fragment zu sein.

Die Existenz von Transkripten spezifisch für das Y-Chromosom und die einzelnen Lampenbürstenschleifen steht in Einklang

mit den zytogenetischen Befunden, daß jede einzelne Lampenbürstenschleife eine spezifische Funktion für die Spermienentwicklung besitzt und ihr Fehlen nicht durch gleichzeitiges doppeltes Vorliegen einer anderen Schleifenstruktur ersetzt werden kann.

Die Intensitäten der Markierungen über den Lampenbürstenschleifen sind reproduzierbar, doch sehr unterschiedlich. Trotzdem sind Aussagen über Komplexität, Menge und Verteilung der Transkripte nicht möglich aufgrund der oben diskutierten Erwägungen. Zusätzlich können die Mengenverhältnisse von in der DNA-Probe vorliegenden codierenden Sequenzen zu der Anzahl synthetisierter RNA-Moleküle entscheidend sein. Ein Auftreten der verschieden intensiven Hybridisierungen als Folge unterschiedlich guter Zugänglichkeiten der einzelnen Schleifenstrukturen kann ausgeschlossen werden, da insbesondere die "Keulen", die nur eine schwache Markierung Y-spezifischer Transkripte zeigen, mit rDNA hybridisiert deutliche Signale liefern.

## 6. Funktion des Y-Chromosoms und seiner Genprodukte in der Spermiogenese

Eine Funktion der identifizierten und lokalisierten Y-spezifischen Transkripte kann anhand der erhaltenen Daten und auf der Basis bisheriger zytogenetischer und molekularar Befunde diskutiert werden.

Sämtliche Information, die für die Spermiogenese in D. hydei benötigt wird, muß während der meiotischen Prophase synthetisiert und gespeichert werden. In postmeiotischen Stadien findet keine RNA-Synthese statt (Hennig, 1967; Lassak, 1981); es werden keine Chromosomen benötigt (Lindsley und Grell, 1969). Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestä-

tigten eine intensive X-chromosomale und autosomale Transkriptionsaktivität in den Kernen der primären Spermatozyten (Glätzer, 1975).

Die Abwesenheit jeder einzelnen Y-chromosomalen Lampenbürstenschleife während der meiotischen Prophase bewirkt unspezifische morphogenetische Defekte während des Spermatidenwachstums. Störungen in Zahl und Muster der Spermienorganelle und Inhibierung der Spermatidenelongation führen zur Blockierung der Spermiogenese, und zwar zu verschiedenen Zeitpunkten in Abhängigkeit von Zahl und Kombination der fehlenden Schleifen. Jedoch ist nie das Fehlen eines bestimmten Organells zu beobachten (Meyer, 1963, 1968, 1969, 1972; Kiefer, 1973; Hanna, pers. Mittlg.).

Das zur Bildung der Spermienorganelle benötigte Material ist folglich ausschließlich X-chromosomaler und/oder autosomaler Herkunft, wird in der meiotischen Prophase transkribiert und durch die meiotischen Teilungen hindurch erhalten und den Spermatiden zugeteilt. Die Genprodukte des Y-Chromosoms sind offenbar weniger Strukturproteine als vielmehr regulatorische und koordinierende Faktoren, deren Wirkung in der Spermiogenese sichtbar wird.

Die hier nachgewiesene Existenz Y-spezifischer und schleifenspezifischer Transkripte in den Spermatozytenkernen könnte ein Hinweis sein auf bestimmte genetische Funktionen einzelner Y-chromosomaler Lampenbürstenschleifen und eine Erklärung für die beschriebenen Phänomene bedeuten.

Die Organisation und Verteilung aller in den Spermatozytenkernen synthetisierten RNA-Moleküle zeigte ein "in situ"-DNA/RNA-Hybridisierungsexperiment mit gesamter radioaktiv markierter DNA aus X/Y-Männchen (Abb. 20). In Gegenwart des "Pseudonukleolus" erfolgt eine ausschließliche und sehr intensive Markierung dieser Schleifenstruktur. In Genotypen ohne "Pseudonukleolus" treten im Kernraum regellos verteilt

mehrere Köneranhäufungen auf: in X/O-Genotypen über anfärbbaren und auch lichtmikroskopisch sichtbaren Ribonukleoprotein-Strukturen und in $X/Y^{S.KT}$-A-Spermatozytenkernen keiner Struktur zuzuordnen.

Bei Vergleich der Hybridisierung von Gesamt-Transkripten mit Y-spezifischen Molekülen am "Pseudonukleolus" fällt bei Einsatz identischer Radioaktivität, Hybridisierungsbedingungen und Expositionszeiten ein großer Unterschied der zu beobachtenden Signalintensitäten auf. Diese Differenz ist - wie schon erwähnt - nicht zu beeinflussen, selbst durch Erhöhung der Menge an unmarkierter DNA auf einen fünffachen Wert. Die Y-spezifischen Moleküle sind stets lokalisiert innerhalb des Bereiches der "Pseudonukleolus"-Struktur, wohingegen die X-chomosomalen und autosomalen Sequenzen angelagertes Material von großer räumlicher Ausdehnung darzustellen scheinen. Die molekulare Analyse einer RNA-Fraktion aus Spermatozytenkernen ergab eine mehrfache Anreicherung X-chromosomaler und autosomaler Transkripte in Gegenwart aller Lampenbürstenschleifen im X/Y-Genotyp gegenüber dem X/O-Genotyp (Knust, 1979).

Der "Pseudonukleolus" scheint im Vergleich mit den anderen Schleifenstrukturen eine besondere Funktion auszuüben. Sämtliche im Kern synthetisierten X-chromosomal und autosomal codierten Transkripte, soweit erfaßbar in der Autoradiographie, werden im Laufe der Spermatozytenentwicklung am "Pseudonukleolus" - wenn vorhanden - als einziger Schleifenstruktur akkumuliert (Abb. 20). Gleichzeitig ist die Vermehrung der dort lokalisierten Y-spezifischen RNA-Moleküle zu beobachten (Abb. 17, 19). Fehlt der "Pseudonukleolus", so liegt das X-chromosomale und autosomale Material zu Aggregaten zusammengefaßt scheinbar ungeordnet im Kernraum. Am "Pseudonukleolus" sind keine erfaßbaren Mengen rRNA vorhanden, wie sie beispielsweise in der "Fäden"-Matrix, an den "Tubulibändern" und den "Keulen" zu finden sind, wo auch gleichzeitig eine erhebliche Anzahl poly(A)-reicher Sequenzen identifi-

ziert werden konnte.

Es wurden mehrfach Modelle diskutiert, die den Y-chromosomalen Strukturen eine Aufgabe der Anreicherung und Stabilisierung von hnRNPs zuwiesen, um sie für die Spermiohistogenese zu konservieren (Hennig, 1967; Knust, 1979, Nellen, 1979). Aufgrund der vorliegenden Daten findet diese Akkumulation X-chromosomaler und autosomaler Transkripte offenbar ausschließlich am "Pseudonukleolus" statt. Ob den dort identifizierten Y-spezifischen RNA-Molekülen eine dafür entscheidende Funktion zukommt, ist jedoch ungeklärt.

Die Resultate der Hybridisierungsexperimente und Vergleiche der schleifenspezifischen Signalintensitäten geben Hinweise darauf, daß diese Y-spezifischen RNA-Moleküle des "Pseudonukleolus" zumindest teilweise repetitiv sind. Die Tatsache, daß bei Einsatz hochspezifischer Hybridisierungstechniken möglicherweise keine Y-spezifische RNA-Fraktion einheitlicher Molekülgröße aus X/A.$Y^{FP}$-Genotypen zu isolieren ist, könnte auf Sequenzen ohne Protein-codierende Funktionen hinweisen. Eventuell sind Protein-codierende Transkripte an den "Tubulibändern" oder den "Keulen" zu suchen, wo anscheinend Moleküle geringerer Anzahl und höherer Komplexitäten zu finden sind. Die Unbestimmtheit dieser Vermutungen ist in der Berücksichtigung zahlreicher Parameter begründet, die - wie bereits ausführlich diskutiert (V.4.) - das Resultat solch eines Experimentes beeinflussen.

## 7. Nachwort

Unbeantwortet bleiben folgende Fragen: Bei Anwesenheit des "Pseudonukleolus" aber gleichzeitigem Fehlen anderer Y-chromosomaler Lampenbürstenschleifen ist die Spermiogenese gestört; also welche Funktionen besitzen diese Schleifen und

ihre Transkripte? Codieren zumindest einige dieser Y-spezifischen Transkripte für Proteine? Bleiben die Y-spezifischen Genprodukte - RNA oder Protein - durch die meiotischen Teilungen bis in die Spermatiden bestehen?

Für eine Klärung der aufgezeigten Problematik wird die Isolierung dieser RNA-Sequenzen notwendig sein. Sie wird jedoch möglicherweise scheitern an den herkömmlichen molekularbiologischen Methoden, die nur erfolgreich sind bei der Identifizierung von Molekülpopulationen einheitlicher Größe und in Hinblick auf das vorliegende System in Anwendung auf die gesuchte RNA ungeeignet zu sein scheinen.

Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Resultate stehen Hybridisierungstechniken zur Verfügung, die - selbst bei Verwendung sehr komplexer DNA-Proben - eine eindeutige Identifizierung spezifischer Sequenzen ermöglichen.

Die nachgewiesene Existenz Y-spezifischer Transkripte und ihre Lokalisation an den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen in Kernen primärer Spermatozyten liefert die molekulare Basis für eine gezielte Untersuchung der Steuerung von Spermatidenwachstum und Spermienentwicklung in der männlichen Keimbahn von D. hydei.

Durch ein Studium dieses Systems als Beispiel eines zytologisch gut charakterisierten und analysierbaren Entwicklungsprozesses könnten grundlegende Einblicke in Regulationsmechanismen einer komplexen Zelldifferenzierung erhalten werden.

"Development and cell differentiation can be viewed as involving a set of binary decisions, the outcomes of each decision determining the possibilities available for the following events. As for this .. sequence of historical contingencies, "we do not have even the faintest idea how it works" ... "

Gunther S. Stent: Tinkering.
The Possible and the Actual.
By F. Jacob.
University of Washington Press (1982).
Cell 30, 335-337, 1982.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die genetische Aktivität des Y-Chromosoms in der meiotischen Prophase von D. hydei kontrolliert die Entwicklung von Spermatiden zu fertilen Spermien. Diese Aktivität ist charakterisiert durch die Ausbildung von Funktionsstrukturen, die - in Analogie zu den chromosomalen Lampenbürstenschleifen in Amphibien-Oozyten - eine Transkription von Y-chromosomaler DNA in den Schleifen vermuten lassen.

Bislang waren alle Bemühungen gescheitert, Y-spezifische RNA aus den primären Spermatozyten zu isolieren. Als Ursache dafür ist zum einen die Existenz jener Sequenzen anzunehmen, die auf dem Y-Chromosom reiteriert vorliegen und zudem X-chromosomal und/oder autosomal codiert sind und in der meiotischen Prophase transkribiert werden. Zum anderen waren die herkömmlichen molekularbiologischen Methoden, angewandt unter unzulänglichen und unkontrollierten Bedingungen, offenbar von entscheidender Auswirkung auf den Erfolg bzw. Mißerfolg bisheriger Studien.

Durch Oberprüfung der allgemein sowohl für Filter- als auch für "in situ"-Hybridisierungsexperimente eingesetzten Techniken wurden Phänomene erkannt und aufgezeigt, die für eine Produktion unspezifischer und damit nicht eindeutig interpretierbarer Resultate verantwortlich waren. Insbesondere die von Pukkila 1975 eingeführte Methode der "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung, weltweit angewandt zum Studium der Aktivität und Funktion der Lampenbürstenchromosomen in Amphibien-Oozyten, hatte zu Mißdeutungen und widersprüchlichen Daten geführt.

Die kinetischen und thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten von DNA/DNA- und DNA/RNA-Hybridisierungen (entsprechende Studien erschienen in den 60er Jahren und dann 1976/77) wurden bei der Wahl der Hybridisierungsbedingungen nicht ausreichend

beachtet, sodaß kontrollierte und definierte Reaktionen nicht gewährleistet waren. So führte die zur Identifizierung von RNA eingesetzte "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierungstechnik zu unspezifischen Signalen, die aus intensiven DNA/DNA-Wechselwirkungen entstanden, jedoch aufgrund gleichzeitig nicht ausreichender oder sogar ungeeigneter Kontrollexperimente nicht als Artefakte identifiziert wurden.

Anhand von Hybridisierungsexperimenten unter eindeutigen und kontrollierbaren Verhältnissen wurden Bedingungen erarbeitet, die in DNA/RNA-Hybridisierungen keine unkontrollierten Reaktionen zulassen: in 1xSSC und 70% Formamid bei 46°C sind ausschließlich DNA/RNA-Hybridmoleküle stabil, nachweisbare DNA/DNA-Wechselwirkungen finden nicht statt.

Die Technik der "in situ"-DNA/RNA-Transkripthybridisierung erscheint besonders geeignet zur Identifizierung und Lokalisation von Transkripten, die wegen extremer Größe, schneller Prozessierung etc. anders nicht erfaßbar sind. Durch Einsatz dieser Technik in Verwendung der entwickelten stringenten Hybridisierungsbedingungen konnte an den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen die Existenz von Transkripten demonstriert werden, deren Sequenzen unter den hier angewandten Kriterien als spezifisch für Y-chromosomale DNA erscheinen. Eine geeignete DNA-Probe (radioaktiv markierte DNA aus X/Y-Männchen, versetzt mit einem 2000- bis 10000fachen Oberschuß an unmarkierter DNA aus X/O- oder X/X-Tieren, sodaß alle X-chromosomalen und autosomalen Sequenzen erschöpfend auskompetiert waren) führte in Präparationen von Kernen primärer Spermatozyten von D. hydei zu schleifenspezifischen Hybridisierungen charakteristischer Intensitäten. Der "Pseudonukleolus" zeigte eine herausragend intensive Markierung.

Die Codierung der schleifen- und Y-spezifischen Transkripte konnte durch "in situ"-Hybridisierungsexperimente unter Einsatz geeigneter DNA-Proben den entsprechenden Y-chromosomalen DNA-Abschnitten zugeordnet werden.

Eine Charakterisierung dieser genetisch aktiven Y-Chromosom-spezifischen DNA-Sequenzen erfolgte durch Analyse Eco RI-behandelter, gelelektrophoretisch aufgetrennter und an Nitrocellulose-Filter fixierter DNA aus verschiedenen D. hydei Genotypen, hybridisiert mit einer geeigneten RNA-Probe (in vivo radioaktiv markierte RNA aus X/Y/Y-Hodenanlagen mit einer großen Menge unmarkierter RNA aus X/O-Männchen). Die resultierenden Hybridisierungsmuster bezeichneten mehrere DNA-Fragmente, die Sequenzen spezifisch für das Y-Chromosom und transkribiert in der meiotischen Prophase enthielten.

In D. hydei ist in postmeiotischen Keimzellen keine RNA-Synthese nachweisbar. Sämtliches Material, das in der Spermiohistogenese benötigt wird, muß in den primären Spermatozyten synthetisiert und gespeichert werden.

Im Laufe der Spermatozytenentwicklung ist an der Lampenbürstenschleife "Pseudonukleolus" die Anhäufung großer Mengen X-chromosomaler und/oder autosomaler Transkripte zu beobachten. Da die am "Pseudonukleolus" lokalisierten und sich ebenfalls vermehrenden Y-spezifischen RNA-Moleküle anscheinend repetitive Sequenzen sehr heterogener Größen darstellen, ist zu vermuten, daß ihre Funktion in direktem Zusammenhang steht mit der Akkumulation und Organisation dieses Materials.

Die Resultate der vorgelegten Arbeit demonstrieren die Existenz von Y-spezifischen Transkripten in der Keimbahn von D. hydei. Durch die Lokalisation dieser RNA-Moleküle an der Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen in Kernen primärer Spermatozyten wird eine Beziehung auf molekularer Ebene hergestellt zwischen Ausbildung der Schleifenstrukturen, genetischer Aktivität des Y-Chromosoms und seiner regulatorischen Funktion in der Spermiogenese von D. hydei.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

ALWINE, J.C., KEMP, D.J., and STARK, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 5350-5354.

BECK, H. (1976). New compound (1) chromosomes and the production of large quantities of X/O males in Drosophila hydei. Genet. Res., Camb. 26. 313-317.

BOYD, J.B., BERENDES, H.D., and BOYD, H. (1968). Mass preparation of nuclei from the larval salivary glands of Drosophila hydei. J. Cell. Biol. 38, 369-376.

CALLAN, H.G., (1957). The lampbrush chromosomes of Sepia officinalis L., Anilocra physodes L. and Scillium catalus Cuv. and their structural relationship to the lampbrush chromosomes of Amphibia. Pubbl. Staz. Zool. Napoli, 29, 329-346.

CALLAN, H.G., and OLD, R.W. (1980). In situ hybridization to lampbrush chromosomes: a potential source of Error exposed. J. Cell Sci. 41, 115-123.

CASEY, J., and DAVIDSON, N. (1977). Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. Nucl. Acids Res. 4, 1539-1552.

COBEL-GEARD, S.R., and GAY, H. (1980). A new simplified method for the preparation of neuroblast mitotic chromosomes from D. melanogaster. Drosophila Information Service 55, 148-149.

DENHARDT, D.T. (1966). A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 29, 641-646.

ECKES, B. (1981). Molekulare Charakterisierung der mitochondriellen DNA von Drosophila hydei und Drosophila melanogaster. Diplomarbeit, Düsseldorf.

GALL, J.G., and CALLAN, H.G. (1962). $^{3}H$ uridine incorporation in lampbrush chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA

48, 562-570.

GLÄTZER, K.H. (1975). Visualization of gene transcription in spermatocytes of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.) 53, 371-379.

GLÄTZER, K.H., and MEYER, G.F. (1981). Morphological aspects of the genetic activity in primary spermatocyte nuclei of Drosophila hydei. Biol. Cell 41, 165-172.

HAMAGUCHI, K., and GEIDUSCHEK, P. (1962). The effect of electolytes on the stability of the Deoxyribonucleate helix. J. Am. Chem. Soc. 84, 1329-1338.

HENNIG, W. (1967). Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Lampenbürsten-Y-Chromosoms in der Spermatogenese von Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.) 22, 294-357.

HENNIG, W. (1968). Ribonucleic acid synthesis of the Y-chromosome of Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 38, 227-239.

HENNIG, W. (1978). The lampbrush chromosome of the fruit fly species Drosophila hydei (Diptera: Drosophilidae). Ent. Germ. 4, 200-210.

HENNIG, W., KUNZ, W., SCHNIEDERS, B., und WILLIAMS, K. (1971). Vergleichende Analyse der nach den Extraktionsmethoden von Kirby und Georgiev aus Mäuseleber extrahierten RNS-Fraktionen. Z. Naturforsch. 26b, 235-243.

HESS, O. (1964). Strukturdifferenzierungen im Y-Chromosom und ihre Beziehungen zu Genaktivitäten, I. Mutanten der Funktionsstrukturen. Verh. Dt. Zool. Ges. 1964: 156-163.

HESS, O. (1965). The effect of X-rays on the functional structures of the Y chromosome in spermatocytes of Drosophila hydei. J. Cell. Biol. 25, 169-173.

HESS, O. (1967). Complementation of genetic activity in translocated fragments of the Y chromosome in Drosophila hydei. Genetics 56, 283-295.

HESS, O. (1968). The function of the lampbrush loops formed by the Y chromosome of D. hydei in spermatocyte nuclei. Molec. Gen. Genet. 103, 58-71.

HESS, O. (1971). Lampenbürstenchromosomen. In: "Handbuch allg. Pathologie" Vol. II/2, 215-281, Springer Verlag, Berlin.

HESS, O. (1974). Local structural variations of the Y chromosome of D. hydei and their correlation to genetic activity. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 38, 663-671.

HESS, O. (1980). Lampbrush chromosomes. In: "The genetics and biology of Drosophila" Vol. 2d, 1-32, Academic Press (eds. Ashburner, M. and Wright, T.R.F.), London 1980.

HESS, O., and MEYER, G.F. (1963). Chromosomal differentiations of the lampbrush type formed by the Y chromosome in Drosophila hydei and D. neohydei. J. Cell. Biol. 16, 527-539.

HESS, O., and MEYER, G.F. (1968). Genetic activities of the Y chromosome in Drosophila during spermatogenesis. Adv. Genet. 14, 171-223.

KIEFER, B.I. (1973). Genetics of sperm development in Drosophila. In: "Genetic mechanisms of development", 47-102, Academic Press (ed. Ruddle, F.H.), New York 1973.

KLOETZEL, P.-M. (1979). Molekulare Untersuchung der Proteine in frühen Spermatogenesestadien von Drosophila hydei und deren Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen. Dissertation, Düsseldorf.

KNUST, E. (1979). Ribonukleoproteinpartikel aus Kernen primärer Spermatocyten von Drosophila hydei: Charakterisierung der RNA und ihre Beziehung zu den Y-chromosomalen Lampenbürstenschleifen. Dissertation, Düsseldorf.

LASSAK, H.-F. (1975). Die Wirkung von alpha-Amanitin auf die RNA-Synthese in larvalen Hodenanlagen von Drosophila hydei. Diplomarbeit, Düsseldorf.

LASSAK, H.-F. (1981). Die Spermatogenese von Drosophila hydei: RNA und Proteine definierter Entwicklungsstadien und ihre Beziehung zum Y-Chromosom. Dissertation, Düsseldorf.

LIFSCHYTZ, E. (1979). A procedure for cloning and identification of Y-specific middle repetitive sequences in Drosophila hydei. J. Mol. Biol. 133, 267-277.

LINDSLEY, D.L., and GRELL, E.H. (1969). Spermiogenesis without chromosomes in Drosophila melanogaster. Genetics 61,

Suppl. 1, 69-78.

LOENING, U.E. (1968). Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution. J. Mol. Biol. 38, 355-365.

MACGREGOR, H.C. (1980). Recent developments in the study of lampbrush chromosomes. Heredity 44(1), 3-35.

MACGREGOR, H.C., and ANDREWS, C. (1977). The arrangement and transcription of "middle repetitive" DNA sequences on lampbrush chromosomes of Triturus. Chromosoma (Berl.) 63, 109-126.

MACGREGOR, H.C., and MIZUNO, S. (1976). In situ hybridization of "nick-translated" $^{3}$H-Ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. Chromosoma (Berl.) 54, 15-25.

MANIATIS, T., JEFFREY, A., and KLEID, D. (1975). Nucleotide sequence of the rightward operator of phase lambda. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 1184-1188.

McCONAUGHY, B.L., LAIRD, C.D. and McCARTHY, B.J. (1969). Nucleic acid reassociation in formamide. Biochemistry 8, 3289-3294.

McEWEN, C.R. (1967). Tables for estimating sedimentation through linear concentration gradients of sucrose solution. Anal. Biochemistry 20, 114-149.

MEAD, C.D. (1964). A deoxyribonucleic acid-associated ribo nucleic acid from Drosophila melanogaster. J. Biol. Chem. 239, 550-554.

MEYER, G.F. (1963). Die Funktionsstrukturen des Y-Chromosoms in den Spermatocytenkernen von Drosophila hydei, D. neohydei, D. repleta und einigen anderen Drosophila-Arten. Chromosoma (Berl.) 14, 207-253.

MEYER, G.F. (1968). Spermiogenese in normalen und Y-defizienten Männchen von Drosophila melanogaster und D. hydei. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 84, 141-175.

MEYER, G.F. (1969). Experimental studies on spermiogenesis in Drosophila. Genetics 61, Suppl. 1, 79-92.

MEYER, G.F. (1972). Influence of Y chromosome on fertility and phenotype of Drosophila spermatozoa. In: "The genetics of the Spermatozoon", 387-405, Proc. Int. Symps. (R.A. Beatty and S. Gluecksohn-Waelsch, eds.), Edin-

burgh and New York.

MEYER, G.F., und HESS, O. (1965). Struktur-Differenzierungen im Y-Chromosom von Drosophila hydei und ihre Beziehungen zu Gen-Aktivitäten. II. Effekt der RNS-Synthese-Hemmung durch Actinomycin D. Chromosoma (Berl.) 16, 249-270.

MEYER, G.F., HESS, O., und BEERMANN, W. (1961). Phasenspezifische Funktionsstrukturen in Spermatocytenkernen von Drosophila melanogaster und ihre Abhängigkeit vom Y-Chromosom. Chromosoma (Berl.) 12, 676-716.

MISCHKE, D. (1978). Versuche zur Isolierung und molekularen Charakterisierung des Y-Chromosoms von Drosophila hydei. Dissertation, Düsseldorf.

MORGAN, G.T., MACGREGOR, H.C., and COLMAN, A. (1980). Multiple ribosomal gene sites revealed by in situ hybridization of Xenopus rDNA to Triturus lampbrush chromosomes. Chromosoma (Berl.) 80, 309-330.

NELLEN, W. (1979). Die RNA prämeiotischer Zellen und ihre Beziehung zu postmeiotischen Störungen der Spermatogenese in Y-defizienten Männchen von Drosophila hydei. Dissertation, Düsseldorf.

OLD, R.W., CALLAN, H.G., GROSS, K.W. (1977). Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by in situ hybridization. J. Cell. Sci. 27, 57-79.

PARDUE, M.L., and GALL, J.G. (1975). Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. In: "Meth. Cell Biol." Vol. X, 1-16.

PUKKILA, P.J. (1975). Identification of the lampbrush chromosome loops which transcribe 5S ribosomal RNA in Notophthalmus (Triturus) viridescens. Chromosoma (Berl.) 53, 71-89.

SCHÄFER, U. (1975). Vitalität und Sterilität in Drosophila hydei x Drosophila neohydei Hybriden. Dissertation, Düsseldorf.

SCHÄFER, U. (1978). Sterility in Drosophila hydei x Drosophila neohydei hybrids. Genetica 46, 205-214.

SCHÄFER, U., and KUNZ, W. (1975). Two separated nucleolus organizers on the Drosophila hydei Y chromosome. Molec. Gen. Genet. 137, 365-368.

SCHILDKRAUT, C.L., and LIFSON, S. (1965). Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. Biopolymers 3, 195-208.

SCHILDKRAUT, C.L., MARMUR, J., amd DOTY, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4, 430-443.

SCHWINGHAMER, M.W., and SHEPHERD, R.J. (1980). Formaldehyde-containing slab gels for analysis of denatured, tritium-labeled RNA. Anal. Biochemistry 103, 426-434.

SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

SCHWOCHAU, M. (1979). Die Technik der präparativen Ultrazentrifugation. GIT Fach.Lab. 23, 357-360 und 1010-1022.

SCHWOCHAU, M., und HERRNSTADT, C. (1982). Hybridisierungen von DNA an Nukleinsäuren cytologischer Präparate. GIT Fachz. Lab. 26, 110-111.

THOMAS, M., WHITE, R.L., and DAVIS, R.W. (1976). Hybridization of RNA to double-stranded DNA: formation of R-loops. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2294-2298.

THOMAS, P.S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205.

VARLEY, J.M., MACGREGOR, H.C., NARDI, I., ANDREWS, C., and ERBA, H.P. (1980). Cytological evidence of transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in Triturus cristatus carnifex. Chromosoma (Berl.) 80, 289-307.

VOGT, P., HENNIG, W., and SIGMUND, I. (1982). Identification of cloned Y chromosomal DNA sequences from a lampbrush loop of Drosophila hydei. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 5132-5136.

YAMASAKI, N. (1977). Selective staining of Y chromosomal

loops in Drosophila hydei, D. neohydei, and D. eohydei. Chromosoma (Berl.) 60, 27-37.

YAMASAKI; N. (1981). Differential staining of Y chromosomal lampbrush loops of Drosophila hydei. Chromosoma (Berl.) 83, 679-684.

## VIII. ANMERKUNGEN

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Martin Schwochau, danke ich für sein intensives Interesse an dieser Arbeit, für kritische Diskussionen und vor allem für seine zahlreichen Ideen und Anregungen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere möchte ich mich für die hervorragende und produktive Zusammenarbeit bedanken, die diese Forschungsarbeit entscheidend beschleunigt und teilweise erst ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Oswald Hess danke ich für ausgezeichnete Arbeitsbedingungen und für die Oberlassung der Fliegenstämme.

Herrn Prof. Dr. Werner Kunz und seiner Arbeitsgruppe bin ich dankbar für die Oberlassung von klonierter rDNA. Herrn Dr. Hans Bünemann und Frl. Beate Eckes danke ich für erhaltene Proben von E. coli- und Lambda- bzw. Mitochondrien-DNA. Für technische Hilfe und insbesondere das Sammeln von Fliegen bedanke ich mich bei Frl. Elvira Hammes, Frl. Astrid Schöning und Herrn Karl Kemper.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Thomas Herrnstadt für die sorgfältige Ausführung der Tuschezeichnungen.

Der vorliegende Text wurde erstellt am Computer-Textsystem 580 (Modelle 5822 und 5823, Siemens) im Rechenzentrum der Universität Düsseldorf. Für Einführungen in die Bedienung der Geräte möchte ich mich bei Frl. Marie-Luise Trump bedanken.

Die Arbeit wurde unterstützt durch Mittel des Bundesministeriums für Bildung und Wissenschaft im Rahmen eines Graduiertenstipendiums, ferner durch Mittel, die Herrn Prof. Dr. M. Schwochau von der Deutschen Forschungsgemeinschaft

(Schw. 170/5) sowie vom Minister für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen zur Verfügung gestellt wurden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Corinna Herrnstadt und Martin Schwochau (1980). Identifikation of functional nucleotide sequences of the Y-chromosome of Drosophila hydei. Eur. J. Cell Biol., Vol. 22, No. 1.

M. Schwochau und C. Herrnstadt (1981). DNA hybridization to nucleic acids of cytological preparations. Eur. J. Cell Biol., Vol. 24, No. 2.

Corinna Herrnstadt und M. Schwochau (1981). Demonstration of Y specific RNA in the primary spermatocytes of Drosophila hydei by "in situ" DNA/RNA-transcript hybridization. Eur. J. Cell Biol., Vol. 24, No. 2.

Schwochau, M., und Herrnstadt, C. (1982). Hybridisierungen von DNA an Nukleinsäuren cytologischer Präparate. GIT Fachz. Lab. 26, 110-111.

M. Schwochau, C. Herrnstadt und B. Eckes (1982). rDNA intervening sequence is transcribed at a high level in certain X/Y males of Drosophila hydei. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 935.

M. Schwochau, C. Herrnstadt und E. Knust (1982). Functional role of the Y-chromosome in the meiotic prophase of Drosophila hydei. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 953.

## IX. LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| Name: | Corinna Herrnstadt |
| Geburt: | 25. Dezember 1955 in Düsseldorf |
| Eltern: | Dipl.-Ing. Thomas Herrnstadt und Leonore Herrnstadt, geb. Müller |
| Wohnsitz: | Düsseldorf, Joachimstrasse 26 |
| Schulbesuch: | April 1962 - März 1966 Grundschule<br>April 1966 - Juni 1974 Gymnasium mit Abschluß Abitur. |
| Hochschulstudium: | Oktober 1974 - Oktober 1976 Grundstudium der Biologie mit Abschluß Vordiplom.<br>November 1976 - Januar 1980 Hauptstudium der Biologie mit Abschluß Diplom im Januar 1980 mit den Schwerpunktfächern Molekular- und Zytogenetik, Pflanzenphysiologie und Organische Chemie; "Vergleich der rRNA-Gengrößen der beiden Y-Nukleolenorganisatoren in kompensierenden und nicht-kompensierenden Organen und in verschiedenen Stämmen bei Drosophila hydei", Diplomarbeit, Institut für Genetik der Universität Düsseldorf.<br>Dissertation: Februar 1980 - Oktober 1982. |

Praktische Tätigkeiten: 1977-1980 Studentische Hilfskraft am Institut für Zoologie und am Institut für allgemeine Biologie der Universität Düsseldorf; 1980-1982 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik der Universität Düsseldorf; 1980-1982 Unterricht im Fach Biologie an der Staatlichen Lehranstalt für Medizinisch-Technische Assistenten an der Universitätsklinik Düsseldorf.